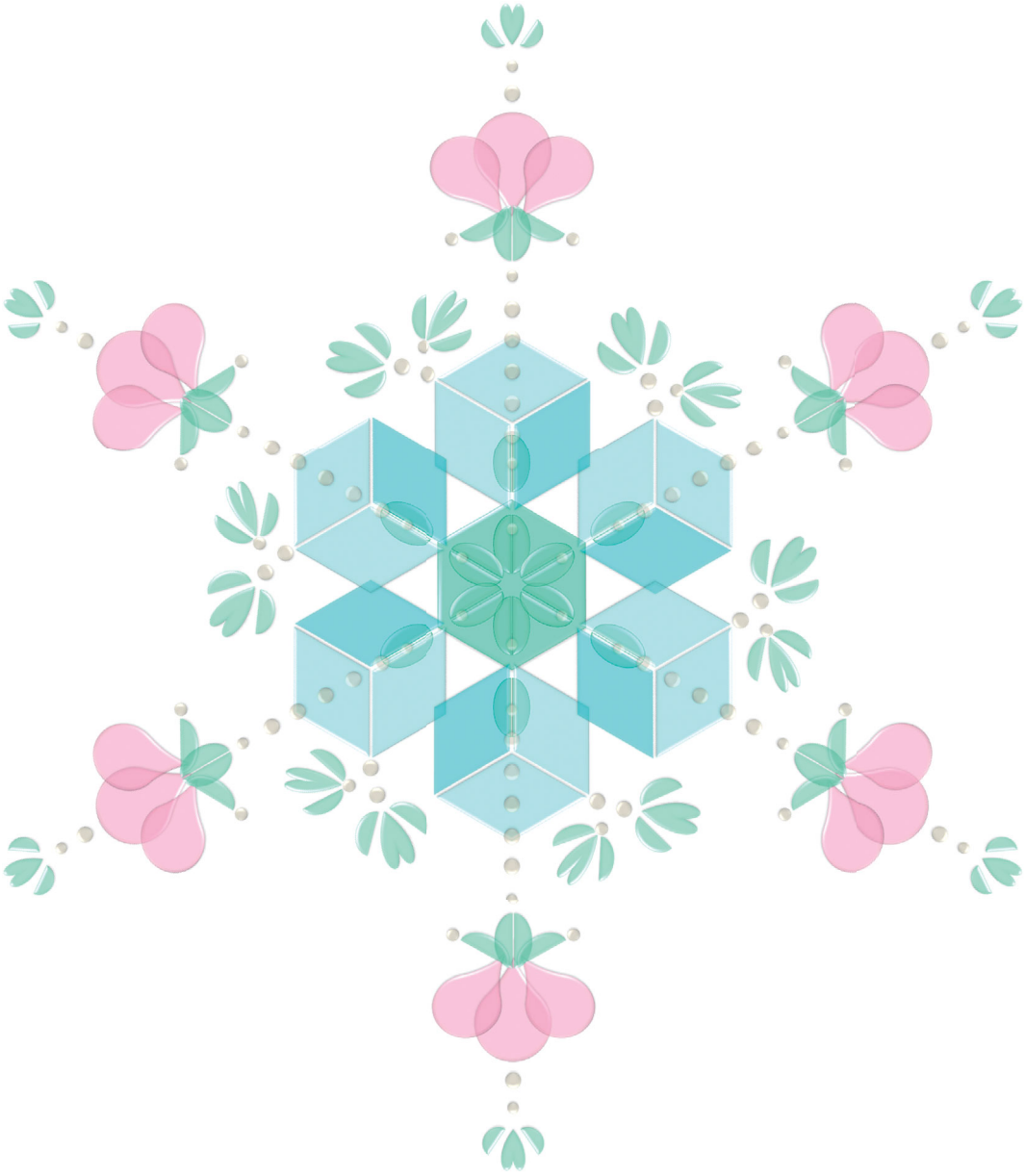
Low Temperature Science
低温科学
第67巻 ●ISSN 1880-7593 ●2008 vol.67

ILTS

# 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
Edited by Institute of Low Temperature Science, Hokkaido University and
The Japanese Association for Photosynthesis Research

# 目次


はじめに　「光合成研究法」編集委員会

## 1章　植物・藻類・細菌の材料の入手と栽培・培養

1－1　光合成細菌 …… 嶋田敬三　3
1－2　シアノバクテリア …… 広瀬侑，佐藤桃子，池内昌彦　9
1－3　クラミドモナス …… 福澤秀哉，久保雄昭　17
1－4　ゼニゴケの培養法 …… 大和勝幸，石崎公庸，河内孝之　23
1－5　ヒメツリガネゴケ …… 青木摂之，杉田護　31
1－6　シロイヌナズナを用いた光合成研究 …… 鹿内利治　35
1－7　タバコ …… 山本義治，小保方潤一　39
1－8　イネ …… 稲垣言要　43
1－9　藻類 …… 村上明男，小檜山篤志　53
1－10　紅藻の培養，入手 …… 榎並勲　61
1－11　珪藻の培養，入手 …… 榎並勲　63

## 2章　個体・環境の測定

2－1　個葉から葉緑体スケールのガス交換
2－1－a　個葉の光合成速度が決まるしくみと測定原理 …… 彦坂幸毅　67
2－1－b　光合成研究のための安定同位体測定法 …… 半場祐子　73
2－1－c　呼吸速度（$CO_2$ 発生速度）測定 …… 野口航　83
2－1－d　酸素発生測定 …… 野口航　89
2－2　個体から群落スケールの $CO_2$ ガス交換
2－2－a　同化箱法による器官や個体レベルのガス交換 …… 野田響，村岡裕由　95
2－2－b　群落の物質生産
2－2－b－1　草本群落の生産構造と群落光合成モデル …… 及川真平　103
2－2－b－2　植物のサイズと成長 ── 成長解析 ── …… 長嶋寿江　113
2－2－b－3　森林生態系の純一次生産量の測定手法 …… 大塚俊之　119
2－2－b－4　微気象学的な測定（渦相関法による測定） …… 斎藤琢　129
2－3　ガスチャンバー法（同化箱法）および重量法による個葉の蒸散特性の評価 …… 松尾奈緒子，三木直子，廣部宗　137
2－4　藻類の光合成関連測定
2－4－a　海洋と湖沼における光合成・環境要因の測定法 …… 鈴木祥弘　143
2－4－b　ガスクロマトグラフィーと酸素電極を用いた無機炭素親和性の測定 …… 大西紀和，福澤秀哉　149
2－5　葉緑体の光合成活性測定 ── 単離葉緑体を用いた炭酸固定測定 ── …… 真野純一　159

## 3章　単離・精製・活性測定

3－1　代謝産物量の定量
3－1－a　CE/MS を用いた陰イオン性代謝産物の定量 …… 原田和生，福崎英一郎　163
3－1－b　安定同位体標識を利用した動的代謝プロファイリング …… 蓮沼誠久，原田和生，三宅親弘，福崎英一郎　169
3－1－c　硝酸還元酵素及び亜硝酸還元酵素の活性測定 …… 前田真一，上坂一馬，小俣達男　175
3－1－d　活性酸素種，抗酸化物 …… 真野純一，Sergey Khorobrykh，尼子克己　179
3－2　光合成膜などの単離
3－2－a　高等植物の葉緑体と葉緑体膜の単離 …… 宮尾光恵　197
3－2－b　光合成細菌の光合成膜 …… 原田二朗，浅井智広，大岡宏造　205
3－3　酵素・電子伝達成分の精製・活性測定・定量
3－3－a　カルビン回路の酵素 …… 田茂井政宏，重岡成　209
3－3－b　フェレドキシンとフェレドキシン：$NADP^+$ 還元酵素の調製と生化学的解析 …… 榊原由紀子，長谷俊治　215
3－3－c　シトクロム …… 永島賢治　223
3－3－d　プラストシアニン …… 日比野隆，田中義人，高倍昭洋　227
3－3－e　プラストキノン …… 柴田勝　233
3－3－f　光化学系Ⅰ反応中心の鉄-硫黄クラスター …… 大岡宏造　245
3－3－g　$CF_0CF_1$，光リン酸化 …… 紺野宏記，久堀徹　249
3－3－h　光化学系反応中心の分光学的定量 …… 村上明男　259
3－4　タンパク質複合体の単離
3－4－a　系Ⅰ複合体の精製法 …… 高橋裕一郎，兒玉なつ美，高橋拓子　265
3－4－b　系Ⅱ複合体の精製法 …… 沈建仁，榎並勲　275
3－4－c　集光装置（LHC） …… 得津隆太郎，Wesley Swingley，皆川純　285
3－4－d　光合成細菌の反応中心・アンテナ複合体 …… 大友征宇，小林正幸，大岡宏造　289

3－4－e　フィコビリソーム
近藤久益子，佐藤桃子，広瀬侑，渡邊麻衣，池内昌彦　295
3－4－f　小型サブユニット　岩井雅子，池内昌彦　303
3－4－g　光化学系Ⅰコアクロロフィル a の分別抽出法　池上勇　309
3－5　色素の分析
3－5－a　クロロフィルおよびクロロフィル代謝経路中間体の抽出・定量法　田中亮一　315
3－5－b　ヘムの分析　高橋重一，増田建　327
3－5－c　バクテリオクロロフィルの分析　民秋均，溝口正　339
3－5－d　カロテノイドの分析　高市真一　347
3－5－e　フィコビリンの単離と分析　石塚量見，池内昌彦　355
3－6　タンパク質
3－6－a　SDS-PAGE　井上（菓子野）名津子，菓子野康浩　359
3－6－b　Blue-Native PAGE　菓子野康浩　373
3－6－c　Native-Green PAGE　菓子野康浩　377
3－6－d－1　二次元電気泳動　岩井優和，皆川純　381
3－6－d－2　ショ糖密度勾配超遠心法　岩井優和，皆川純　385
3－6－e　タンパク質の質量分析　小澤真一郎，井上（菓子野）名津子，高橋裕一郎　387
3－6－f　カラムクロマトグラフィー　小澤真一郎，岡室彰，高橋裕一郎　397
3－6－g　界面活性剤　小澤真一郎，高橋裕一郎　409
3－6－h　ウェスタン分析　大西岳人，高橋裕一郎　415
3－6－i　嫌気条件下でのタンパク質精製　藤田祐一，野亦次郎　423

4章　分光測定
4－1　分光測定の基礎　小池裕幸　431
4－2　分光測定法
4－2－a　蛍光　秋本誠志　449
4－2－b　熱発光・遅延発光　小野高明　453
4－2－c　閃光分光法と差スペクトル　伊藤繁　465
4－2－d　EPR 法　三野広幸　473
4－2－e　光誘起フーリエ変換赤外差スペクトル法　野口巧　483
4－2－f　共鳴ラマン分光法　野口巧　491
4－2－g　葉群の分光反射と分光植生指数　中路達郎　497
4－3　パルス変調蛍光
4－3－a　クロロフィル蛍光と吸収による光合成測定　園池公毅　507
4－3－b　PAM およびガス交換測定器を用いた，蛍光および二酸化炭素同時測定による植物の光エネルギー利用の評価　── ガス交換解析とクロロフィル蛍光の同時測定 ──　牧野周　525
4－3－c　光化学系Ⅰサイクリック電子伝達の活性測定　宗景ゆり　529
4－3－d　高等植物葉緑体チラコイド膜光化学系Ⅱおよび Ⅰ 電子伝達活性の生葉での同時測定　三宅親弘　533
4－3－e　二次元解析　高見常明，遠藤剛　539
4－4　酸化還元滴定　永島賢治　545
4－5　電子伝達活性　沈建仁　551
4－6　水素発生　増川一　561
4－7　膜電位の測定　伊藤繁　567

5章　形質転換
5－1　シアノバクテリア
5－1－a　シアノバクテリアの形質転換法　岩井雅子，広瀬侑，池内昌彦　575
5－1－b　PCR を使った Synechocystis の高速簡便遺伝子破壊法　佐藤直樹　583
5－2　クラミドモナス
5－2－a　核ゲノム　福澤秀哉，久保雄昭　587
5－2－b　葉緑体ゲノムの形質転換　皆川純　591
5－3　ゼニゴケ
5－3－a　アグロバクテリウムによるゼニゴケ核ゲノム形質転換法　石崎公庸，河内孝之　597
5－3－b　ゼニゴケの培養細胞と植物体のプラスチド形質転換法　千代田将大，河内孝之　601
5－4　ヒメツリガネゴケ　杉田護，田崎瑛示，香村吉洋　607
5－5　シロイヌナズナの形質転換　鹿内利治　615
5－6　タバコ
5－6－a　核ゲノム　長尾一生，山本義治，小保方潤一　617
5－6－b　葉緑体ゲノム　黒田洋詩　623
5－7　アグロバクテリウム法によるイネの形質転換　増本千都，宮尾光恵　641
5－8　光合成細菌 Rhodobacter capsulatus における大量発現系と形質転換　藤田祐一，野亦次郎　649

6章　バイオインフォマティクス
6－1　比較ゲノムによる光合成関連遺伝子の推定　佐藤直樹　657
6－2　発現プロファイルの利用　遠藤剛，高林厚史　663
6－3　光合成遺伝子の同定　横野牧生，田中亮一，田中歩　669
6－4　光合成生物のオミックスデータベース利用法　成川礼，岡本忍　673

# はじめに

植物は，太陽光を吸収して成長します．なぜ植物が成長できるのかは近代までは大きな謎でした．植物の口は地中にあり，根から取り込んだ材料で成長するとも考えられました．しかし，ポットで植物を育てると，ポット全体の重さ（植物と土壌の重さの和）が増えるという実験は，この考えを否定し，「植物は新たに物を作り出す」という考えを生みました．様々な実験や，酸素の発見を通して，植物は，光エネルギーを利用して光合成を行うことが百年ほど前にわかりだしました．

その後の研究の発展は著しく，光合成という生物学の研究に，物理や化学の最先端の実験手法が積極的に用いられました．1960-70 年代には光反応，２つの光化学系，酸素発生，Ｚスキーム型の電子伝達系，電荷分離，そして電子と水素イオンの動きに共役した ATP 合成など，反応の原理があきらかになりました．日本光合成研究会が設立され(1979 年)，会員を中心に 1981 年には「光合成研究法」（加藤栄，宮地重遠，村田吉男編，共立出版）が出版されました．

光合成研究には，レーザ分光や，計算科学，電子移動やエネルギー移動理論，遺伝学，Ｘ線結晶学など，先端的な研究手法が，絶えず積極的に使われてきました．色素系による光の吸収，励起エネルギーの移動，電荷分離などの超高速現象の研究には先端物理手法が使われました．絶対嫌気性の光合成細菌から，酸素を出すシアノバクテリア，植物，珊瑚などの共生生物にいたる光合成の多様性や進化の道筋の研究では，細菌学，生化学，遺伝子工学が活躍しました．さらに農業，農薬，生態，地球規模での環境問題までを対象に，広範な光合成研究が，実験を主体に進められています．

最近の遺伝子工学やゲノム科学の進歩，グローバルな環境やエネルギー問題，$CO_2$ 削減計画は全く新しい光合成の理解と研究の展開をもたらしつつあります．より広汎な人々が光合成に興味を持ち，理解したい，知識を利用したいと考えるようになりました．しかし，光合成の理解には分野を超えた，深く，多様な知識が必要であり，一個人や一学科だけでの教育や，実習では不十分であり，新たな参入には困難が伴います．このような状況のもとで，専門家，非専門家，初学者，ベテランを問わず，個別の専門の枠を超えた「現時点での光合成研究の知識と成果」を，たやすく，正しく，効率よく利用できる環境を作りたいと，我々「日本光合成研究会」の研究者は考えました．

この環境を最も速く実現するために，我々は低温科学研究所が発行する「低温科学」シリーズの一つとしてこの新「光合成研究法」を出版します．このシリーズは，一般販売しないので，本書の配布には限界があります．しかし，ほぼこのままウェブ上に公開いたしますので，研究者や学生，産業人，など必要な人々はだれでも容易に利用できます．ダウンロードいただければ，検索や利用もしやすく，ウェブ上でもさらに使いやすいものになっていくと考えます．研究や教育基盤を構築する一つの新しい手法となってほしいと期待しています．「光合成辞典」（日本光合成研究会編集委員会・委員長　高宮建一郎　2003 年　学会出版センター）との併用も便利かと思います．

「光合成研究法」は，日本光合成研究会の幹事を中心とした編集委員会が議論を重ね，編集，出版作業を進めました．項目は編集委員会と著者の提案をもとに決定し，最終的に 97 項目となりました．各項目の短期間無償での執筆を，快く引き受けてくださった著者の方々，編集作業をお世話いただいた北海道大学低温科学研究所の中條将喜氏，岸本純子氏，㈱アイワードの松木新氏，すてきな表紙を描いていただいた岩城雅代氏に心より感謝いたします．

この皆の思いが雪のように結晶した「光合成研究法」が，これからの光合成研究と科学の発展に寄与することを願っています．

2008 年 3 月

「光合成研究法」編集委員会

池内昌彦　伊藤　繁　鹿内利治　園池公毅　田中　歩　村岡裕由　三宅親弘

日本光合成研究会（http://wwwsoc.nii.ac.jp/photosyn/index.html）

# 1章

# 植物・藻類・細菌の材料の入手と栽培・培養

# 1．光合成細菌

嶋田　敬三[1)]

酸素非発生型光合成機能を持つ細菌は絶対好気性のものを含め200種ほどが記載され，主に菌株保存機関から入手できる．培地，培養法は種や目的によりさまざまであるが，よく用いられる条件について注意点を記した．

## Photosynthetic Bacteria: Culture and maintenance

Keizo Shimada

Many species of anoxygenic photosynthetic bacteria belonging to four phyla have been isolated and deposited to culture collections. Various culture media and cultural methods have been developed. In this section, notable points for preparation of culture media and cultural skills for frequently used species are described with a few examples.

シアノバクテリアを除く原核光合成生物を慣習的に〝光合成細菌〟と呼ぶ．大別すると紅色細菌，緑色イオウ細菌，緑色糸状（繊維状）細菌，ヘリオバクテリアのそれぞれ別の門（Phylum）に属する4つのグループに分けられる．いずれも酸素を発生しない〝酸素非発生型光合成〟を行う能力を持つ．1970年代まではすべて絶対嫌気性あるいは通性嫌気性で，通性嫌気性のものでも光合成装置は嫌気条件下のみで合成されるとされてきたが，1978年に芝，佐藤らにより好気条件下で酸素呼吸に主に依存しながら少量の光合成装置を合成するいわゆる〝好気性光合成細菌〟が見出され，近年海洋を中心に多くの種が単離されるようになった[1−3)]．ここではすでに単離されている光合成細菌を培養・維持する方法についてその概略を述べる．

### 1.1　入手法

好気性を含め多くの光合成細菌がDSMZ（Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH）やATCC（American Type Culture Collection）などから購入できる．国内ではIFOを引き継いだ製品評価技術基盤機構生物遺伝資源部門（NBRC）あるいは理研バイオリソースセンターに光合成細菌株が保存されており分与を行っている．詳細は以下のオンラインカタログのサイトを参照されたい．

DSMZ：http://www.dsmz.de/microorganisms/main.php?contentleft_id＝6
ATCC：http://www.atcc.org/ATCCAdvancedCatalogSearch/tabid/112/Default.aspx
NBRC：http://www.nbrc.nite.go.jp/gene.html
理研BRC：http://www.jcm.riken.go.jp/JCM/JCM_Home_J.shtml

このほか場合によっては国内の大学のラボなどから分与を受けることが可能な株もある．

### 1.2　培地

光合成細菌は上記のように4つのグループに大別されるが，培地，培養法はひとつのグループの中でもさまざまであり，場合によっては同じ種でも株（strain）によって異なる場合がある．上記の各菌株保存施設のカタログにもそれぞれの種独自の培地が記されているものもあるが，目的と異なる培地のみが示されている場合や，必ずしもそれぞれの種や株に最適とは言えない一般性のある培地のみが示されている場合もある．たとえばDSMZのカタログでは紅色非イオウ細菌の多くの種に対して共通な培地（Rhodospirillaceae Medium）が示され，嫌気条件にするため窒素ガスの通気などやや面倒な方法が記されているが，特定の種にとっては不要と考えられる成分（例えばいくつかのビタミン）や操作（厳密な嫌気状態の形成など）も含まれている場合が多い．実際，実験によく用いられている紅色非イオウ細菌の多くは通性嫌気性で酸素に強く，培地が最初から厳密な嫌気状態であ

1）首都大学東京理工学研究科生命科学専攻

る必要はない場合が多い．したがって，実験の目的にもよるが，はじめて扱う株の培養にあたっては，可能な限り実際にその株を使った論文あるいは経験者にあたってみることが望ましい．

培地には光独立栄養条件用の無機培地と（光）従属栄養培養のための有機培地がある．通常，完全無機培地を用いるのは紅色および緑色イオウ細菌の一部だけで，多くの場合多少なりとも有機物を加えた培地を用いる．いわゆる紅色非イオウ細菌も $H_2$ などを電子供与体とする独立栄養生長は可能であるが，菌体を得る目的の場合は乳酸，コハク酸などの有機物を炭素源かつ電子供与体として光従属栄養的に生長させる場合がほとんどである．

有機培地でも無機塩類を加える必要のあるものも多い．同じ無機塩類をよく使う場合は終濃度の 50〜100 倍程度の無機塩類のみの Basal Salt Solution を作り置きする場合が多いが，作成の際には水酸化鉄（Ⅲ）を生じない（アルカリにしない）ようにする，リン酸塩の沈殿を生じないためにリン酸カリウムなどは別の Stock Solution にする，などの注意が必要である．微量元素（Trace elements）も通常別に濃い Stock Solution を作っておいて少量を Basal Salt Solution に加えて用いる．

培地に加える成分でしばしば欠かせないものとしてビタミン類がある．紅色あるいは緑色イオウ細菌はビタミン $B_{12}$ のみ加えれば良い場合が多いが，紅色非イオウ細菌のビタミン要求性は種によってさまざまであるため Bergey's Manual[4,5] などで確認する必要がある．可能性のあるビタミン類をすべて含んだ Vitamin mixture を作っておいて用いても良いが，オートクレーブ滅菌が出来ないもの（パントテン酸）もあるので注意を要する．

これに限らず，熱耐性，揮発性などの理由でオートクレーブ滅菌に適さない物質（炭酸水素ナトリウムなど）はろ過滅菌して培地に加える必要がある．他の物質との反応性のためオートクレーブ滅菌を分けて行わねばならないもの（硫化ナトリウム，グルコースなど）もあるが，少量の場合はろ過滅菌を行う方が手間はかからない．

過去現在を通じて多く用いられている光合成細菌は Proteobacteria 門 $\alpha$ ないしは $\beta$ クラスに属するいわゆる紅色非イオウ細菌で，*Rhodobacter (Rba.) sphaeroides*, *Rhodopseudomonas (Rps.) palustris, Rhodospirillum (Rsp.) rubrum, Rubrivivax (Rvi.) gelatinosus* などの通性嫌気性の種が多い．これらは酸素に強いため特に培地から酸素を除く操作は必要としない．しかし，紅色非イオウ細菌であっても *Rsp. photometricum, Pheospirillum (Phs.) molischianum* などの酸素に弱い種では，酸素を除くため培地に少量のアスコルビン酸やシステインあるいは微量の硫化水素（$Na_2S$ として）を加えることがしばしば行われる．

培地あるいはそれを使った光合成細菌の単離法，培養・維持については可能なら文献[6−9] も参照されるとよい．また，いくつかのよく使われる光合成細菌種について筆者らが使っている培地･培養の例も最後（1.5）に挙げる．

## 1.3 培養法

### 1.3.1 嫌気光合成培養

好気性光合成細菌以外の光合成細菌の液体培養は，多くの場合嫌気条件で密閉可能なガラス容器中で光照射することにより行われる．特に緑色イオウ細菌など絶対嫌気性光合成細菌の場合は嫌気光合成培養以外の培養法はない．*Rhodobacter* や *Chloroflexus* のような通性嫌気性細菌の場合は容器内に多少空気層を残して，菌体が沈殿しがちな場合に時々容器を振って菌体を攪拌分散させてやると良い．なお，容器を密閉するため温度変化やガス発生に伴う内圧変化で容器破損が起こることがあるので，場合によっては注意・対策が必要である．

絶対嫌気性細菌の場合でも，ヘリオバクテリアのような極端に酸素に弱いもの以外，特に生化学的な研究に良く用いられるような種には，植継ぎの際などに培地に多少の酸素が混入しても実質的な影響はないものが多い．しかし，光を与えるにあたっては通性嫌気性の種でも，緑色糸状細菌以外は，植継ぎ後しばらく暗所に置いて培地中の酸素を消費させてからにするなど，酸素存在下で強い光に当てることは避けた方が良い．

絶対嫌気性の種の場合，単離などのため寒天プレートでの培養が必要な場合にプレートを嫌気条件下に置いて光照射を行う必要がある．このためには嫌気チャンバーが使えれば理想的ではあるが，多少とも酸素耐性のあるものなら Gas Pack（BD BBL），アネロパック（三菱ガス化学）などの嫌気ジャーを用いたシステムを利用するか，食品用の脱気密封システムを使ってプレートをエージレスなどの脱酸素剤と共にディスポーザブルの袋に密封して（しばらく暗中に置いて）明条件に置くことで，光合成細菌コロニーを得る方法がある．この他，試料を寒天培地中に薄く分散して細いガラスチューブに入れ両端を密封して光嫌気培養を行ってコロニーを得る方法もある[7,9]．また，通常の嫌気性細菌でも用いられる穿刺培養も保存のためなどには良く用いられる．

### 1.3.2 好気培養，半好気（Semi-aerobic）培養，微好気培養

上記のように紅色非イオウ細菌には多くの通性嫌気性細菌がおり，酸素呼吸でも生育する．酸素濃度が高いと色素や光合成タンパクの合成は抑制されるが，生育は光合成培養より早い場合が多い．酸素濃度を抑制したいわゆる半好気（semi-aerobic）培養では生育速度は遅くなるが，色素や光合成タンパクの合成は行われる．したがって，半好気培養は光合成機能欠損株の培養などによく用いられる．なお，上記のように酸素存在下での光照射は生長阻害を起こすため，紅色非イオウ細菌の好気培養あるいは半好気培養はあまり強い光のない場所で行う必要がある．

酸素に弱い紅色非イオウ細菌でも微好気生育が可能とされている種がある．しかし，これは非常に微妙な条件でのみわずかな生育が見られるという意味で，ある程度の菌体量を得る培養として用いることは難しい．

紅色非イオウ細菌のほか *Chloroflexus* の類にも好気培養が可能な種・株が多くあるが，高温による水分の蒸発が激しいため好気培養はやや注意が必要である．

通性嫌気性光合成細菌では寒天プレート培養も好気暗条件下でよく行なわれる．コロニーの小さいうちは無色でも，生長につれコロニー内部の酸素濃度が下って色素合成が起こるため，嫌気ジャーなどを用いなくても他の菌との判別が容易であるためである．

*Roseobacter* などのいわゆる好気性光合成細菌は嫌気光合成条件では生育しないため，暗中での振盪培養や通気による好気培養で生育させる．色素や光合成タンパクも好気条件でのみ合成されるが，必ずしも酸素濃度は高いほど良いとは限らない場合もある[10]．好気性光合成細菌でも色素や光合成タンパクの合成は光によって抑制される種が多いので，通常培養は暗黒下で行う．

### 1.3.3 その他の培養法

通性あるいは好気性の種では系統にもよるが，脱窒（denitrification）や DMSO（dimethylsulfoxide），TMAO（trimethylamine N-oxide）を電子受容体とする嫌気呼吸が可能なものもあり，必要に応じてこのような嫌気呼吸による培養も行われる[11]．

### 1.3.4 光源

光合成細菌はいずれの種もバクテリオクロロフィルによる主吸収帯が近赤外領域にあるため，嫌気光合成培養に用いられる光源としては通常タングステンランプが用いられる．蛍光灯でも原理的には生育可能であるが，生長速度はかなり遅い．一方，タングステンランプは熱線も強いので培養は光源から離すか水層を隔てて光照射する必要がある．特に夏場は冷却可能なサーキュレーターを備えた水槽に培養容器を浸して光照射をするのが安全であろう．熱発生の少ない近赤外 LED を光源として用いれば発熱の問題は回避できると考えられる．

培養に用いる光強度は目的によって異なる．液体の大量培養では光が全細胞に行き渡るように強い方が良いが，チューブなどによる少量の培養の場合は強光では色素・光合成タンパクの合成抑制があり得るし，酸素が残存していると生育阻害が起こることがある．特に緑色イオウ細菌など本来あまり明るくない環境にいるものは弱い光の方が良い場合が多い．

### 1.3.5 温度

培養温度は好熱菌でない限り 30°Cがよく用いられる．しかし，これは同時に他の種も培養する場合の妥協点で，至適温度は種により多少異なる．したがって単独で培養する場合は Bergey's Manual[4,5] などを参照してその種の至適温度に合わせたほうが良い．なお，DSMZ のカタログでは 25°Cが指示されている種が多いが，実際の至適温度はこれより高いものが多い．一方，上記のようにタングステンランプを光源に用いる場合は温度が上がり過ぎないような環境が必要である．

*Chloroflexus, Chlorobaculum tepidum* などの（中度）好熱菌の場合は恒温水槽で培養すると水蒸気の発生が著しいため水槽に蓋をする必要が生じる．蓋に水滴が多量につくなどの問題があるため，外から光照射が可能な乾式の恒温インキュベータがあれば便利である．

## 1.4 保存

光合成細菌の長期保存法としては通常の細菌と同じく 15%グリセロールあるいは 5 %ジメチルスルホキシド（DMSO）中などでの凍結保存（−70°C以下）が多くの場合有効であるが，穿刺培養あるいは液体培養のままでも数ヶ月あるいは 1 年以上生存可能な種も少なくない．歴史的にしばしば生理・生化学実験に用いられている種・系統は多くがこのような丈夫なものなので，このようなものを時々実験に用いる場合は必ずしも超低温槽は必要なく，3 ヶ月から半年ごとくらいに植え継いでおけばよい．なお，前記の *Rsp. photometricum* や *Rhodocyclus purpureus* のような酸素に弱い種についてはもう少し頻繁に（毎月一回程度）植え継ぐことが薦められている[6]．

液体培養のまま保存すると菌体は沈殿するが，色調が変わらない限り新しい培地に多めに植え継げば生育を再開する場合が多い．なお，液体培養の状態での保存は暗所よりは多少とも光がある場所で培養温度より低い温度

あるいは冷蔵庫中が良い[6]と言われる．

## 1.5 培地および培養例

よく使用される種では菌株保存施設のカタログに記されている培地より作製が簡便な培地を用いる場合も多い．その例を示す．

【PYL medium】

この培地は天然培地のため組成が単純で作製に手間がかからない点が長所である．*Rps. palustris* など種によっては水道水など多少の無機イオンの含まれる水を用いればBasal Salt Solutionを省いても十分な生育が得られる培地である[12]．炭素源は乳酸ばかりでなくコハク酸（2Na-Succinate）などを用いても良い場合が多い．

*Rps. palustris, Rsp. rubrum, Rvi. gelatinosus* および *Rba. sphaeroides* のいくつかの株が良好な生育を示す．なお，アンモニウム塩が含まれていないため *Rps. palustris* などではニトロゲナーゼからの水素ガス発生があり，容器を密閉していると破裂することがあるので栓を緩めるなどしてガス抜きをする必要がある．

なお，下記のようなBasal Salt Solutionにコハク酸などの炭素源，硫酸アンモニウムなどの窒素源およびリン酸塩，ビタミン類を加えた合成培地（さらにYeast Extractを加える場合も多い）も多く利用される．

培地組成（1 Lあたり）

| | |
|---|---|
| 1．Yeast Extract | 1 g |
| 2．Polypeptone | 5 g |
| 3．Na-Lactate | 2〜5 g |
| 4．Basal Salt Solution[a] | 10 ml |

pH 7.0にあわせる．

[a]Basal Salt solution（1 lあたり）

| | |
|---|---|
| EDTA-3Na | 4.12 g |
| $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ | 1.11 g |
| $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ | 24.65 g |
| $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ | 2.94 g |
| NaCl | 23.4 g |
| Trace element solution[b] | 10 ml |

[b]Trace element solution（500 mlあたり）

| | |
|---|---|
| $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ | 5.58 g |
| $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ | 1.44 g |
| $Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ | 1.46 g |
| $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ | 1.26 g |
| $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ | 1.21 g |
| $H_3BO_3$ | 1.55 g |
| EDTA-3Na | 20.6 g |

【*Allochromatium (Alc.) vinosum*（旧称 *Chromatium* strain D）用培地】[13]

紅色イオウ細菌には酸素を嫌う種が多く，培地作製や培養も手間のかかるものが多いが，*Alc. vinosum* は例外的に酸素にも強く扱いやすい種である．さらに硫化水素耐性も強いため，滅菌操作を省いても硫酸還元菌以外は混入しにくく滅菌設備のない施設でも利用できるという長所がある．ただし，純粋培養では硫化水素が枯渇しやすいため，実際は硫酸還元菌を共存させたままの状態で維持・培養することが多い．

培地組成（1 lあたり）

| | |
|---|---|
| 1．NaCl | 10 g |
| 2．$KH_2PO_4$ | 0.5 g |
| 3．$K_2HPO_4$ | 0.5 g |
| 4．$NH_4Cl$ | 1 g |
| 5．$MgCl_2 \cdot 6H_2O$ | 0.5 g |
| 6．$CaCl_2 \cdot 2H_2O$ | 0.06 g |
| 7．$FeCl_3 \cdot 6H_2O$ | 5 mg |
| 8．$NaHCO_3$ | 3 g |
| 9．$Na_2S_2O_3$ | 2 g |
| 10．$Na_2S \cdot 9H_2O$ | 1 g |

1〜7は2倍液をStock Solutionとしておくとよい．8〜10は使う直前に加える．

この培地に（通常より）かなり多めに（たとえば1/4〜1/3）植継ぐと生長開始が速い．

【緑色イオウ細菌用培地】[14]

緑色イオウ細菌は独特のバクテリオクロロフィルとそれから成る光捕集装置〝クロロソーム〟を持ち微弱光下での生育が可能な特徴を持つ．一般にはやはり培養が容易でない種が多いが，*Chlorobium limicola f. sp thiosulfatophilum, Chlorobaculum tepidum* などチオ硫酸塩も電子供与体として利用できる種・株は比較的容易に培養できる．

培地組成（1 lあたり）

| | |
|---|---|
| 1．$KH_2PO_4$ | 2.2 g |
| 2．$K_2HPO_4$ | 0.5 g |
| 3．EDTA-3Na | 0.05 g |
| 4．$(NH_4)_2SO_4$ | 0.4 g |

| | |
|---|---|
| 5．$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ | 0.4 g |
| 6．NaCl | 0.4 g |
| 7．$CaCl_2 \cdot 2H_2O$ | 0.1 g |
| 8．Fe-EDTA | 5 mg |
| 9．Trace Elements | |
| 10．$CH_3COO\ NH_4$ | 0.5 g |
| 11．$Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$ | 2.0 g |
| 12．$VB_{12}$(0.004%) | 0.5 ml |
| 13．$NaHCO_3$ | 2 g |
| 14．$Na_2S \cdot 9H_2O$ | 0.6 g |

1～9 は Stock Solution としておくとよい．これに 10～12 を加えオートクレーブ滅菌し，最後に 13，14 をろ過滅菌で加える．植菌した後空気をほとんど残さないように容器に密栓をし，暗所に数時間置いてから（酸素を吸収させた後）弱めの光で培養する．なお，好熱菌の場合は容器に温度変化に伴う圧力がかからないような工夫が必要となる．

## 参考文献


1）T. Shiba, U. Shimidu, & N. Taga, Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish. **45** (1979) p.801.
2）K. Sato, FEBS Lett., **85** (1978) p.207.
3）V. Yurkov & J. T. Csotonyi, The Purple Phototrophic Bacteria, eds. C. N. Hunter, F. Daldal, M. C. Thurnauer and J. T. Beatty, Springer Netherlands, 2008, p.31
4）Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (2nd edition) vol. 1, eds D. R. Boone and R. W. Castenholz, Springer-Verlag, 2001
5）Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (2nd edition) vol. 2, eds D. J. Brenner, N. R. Krieg and J. T. Staley, Springer, 2005
6）H. Biebl & N. Pfennig, The Prokaryotes, eds. M. P. Starr, H. Stolp, H. G. Truper, A. Balows, and H. G. Schlegel, Springer-Verlag, 1981, vol. I, p.267
7）N. Pfennig & H. G. Truper, The Prokaryotes, eds. M. P. Starr, H. Stolp, H. G. Truper, A. Balows, H. G. Schlegel, Springer-Verlag, 1981, vol. I, p.278
8）R. W. Castenholz, & B. K Pierson, The Prokaryotes, eds. M. P. Starr, H. Stolp, H. G. Truper, A. Balows, H. G. Schlegel, Springer-Verlag, 1981, vol. I, p.290
9）星野八洲雄，「光合成細菌」北村博，森田茂廣，山下仁平編，学会出版センター，1985，p.18
10）T. Shiba, Plant Cell Physiol. **28** (1987) p.1313.
11）T. Satoh, Arch. Microbiol. **115** (1977) p.293.
12）A. Fukushima, K. Matsuura, K. Shimada, & T. Satoh, Biochim. Biophys. Acta **933** (1988) p.399.
13）S. K. Bose, Bacterial photosynthesis, eds. H. Gest, A. San Pietro, L. P. Vernon, Yellow Springs, Antioch Press, 1963, p.501
14）T. M. Wahlund, C. Woese, R. W. Castenholz, & M. T. Madigan, Arch. Microbiol. 1**56** (1991) p.81.

# 2．シアノバクテリア

広瀬　侑[1)]，佐藤　桃子[1)]，池内　昌彦[1)]

シアノバクテリアは真正細菌の中で独自の分類群を構成するが，非常に多様で生態学的にも重要である．またモデル生物として研究が非常に進んでいる．研究材料として代表的な種を選んでその特徴を概説する．

## Cyanobacteria

Yuu Hirose, Momoko Sato, Masahiko Ikeuchi

Cyanobacteria are the only group of prokaryotes that perform oxygenic photosynthesis. They consist of diverse varieties of species, such as unicellular or filamentous, nitrogen-fixing, motile or non-motile, obligate or facultative phototrophic ones. We summarized features of these various cyanobacterial species and a primitive eukaryote Cyanophora. Culture protocols and some tips were also included.

### 2.1　背景

シアノバクテリア（ラン色細菌，ともいう）は酸素発生型光合成を行う唯一の真正細菌として独自の分類群を形成しており，光合成をしない種は知られていない．多くの系統樹によれば，シアノバクテリアの群の内部から植物の葉緑体が派生したようにみえるが，葉緑体の直系の祖先種は確定していない．シアノバクテリアは古くは「ラン藻（藍藻）blue-green algae」ともいわれたが，真正細菌に属する原核生物であるため，分子生物学や光合成の分野ではあまり使われなくなった（藻類学や植物学では今でも使われている．）．シアノバクテリアの分類・学名は非常に混乱しており，現在通用している属名や種名のいくつかはリボソーム RNA などの塩基配列による分子系統を反映していない．そのため，種名の同定を延期して，世界的に通用している株保存センター（PCC：仏 Pasteur Culture Collection など）の「株番号」で代用しているものも多い．また，*Synechococcus* や *Oscillatoria* などは異なるグループに分かれるので，近い将来にはその属名も改訂されると思われる．なお，多くのシアノバクテリアのゲノム情報は CyanoBase（http://bacteria.kazusa.or.jp/cyanobase/）から得られる．また，遺伝子機能などから得られる．詳細は 6.4 を参照されたい．

1）東京大学大学院総合文化研究科広域科学専攻生命環境科学系

### 2.2　代表的なシアノバクテリアの特徴と入手法

シアノバクテリアのゲノム情報は多くの種で決定されており，研究の標準株は，特定の古典的な培養株からゲノム決定種に大きく移行しつつある．以下に，代表的なゲノム決定種もしくは進行中の株の特徴と入手法を記す．

#### 2.2.1　*Synechocystis* sp. PCC 6803

1968 年に淡水から単離され，1996 年に全ゲノムの塩基配列が決定された[1)]．3573471 bp の環状ゲノムで，約 3100 個の遺伝子，ORF が推定されている．7 種のプラスミドも決定されている．*Synechocystis* は単細胞性球菌（約 2 $\mu$m）で，直交する 3 平面で細胞分裂する．非窒素固定型だが，グルコースを利用して光従属栄養増殖や光活性化による完全従属栄養増殖ができる．光合成色素としては，クロロフィル *a*，カロテノイドとフィコシアノビリンをもち，フィコエリスロビリンをもたない．起源は同じであるが，実際の表現型は異なる多数の培養株が，同じ〝PCC 6803〟で記載されることが多いので注意が必要である[2)]．代表的な株は，フランスのパスツール研究所の PCC（http://www.pasteur.fr/recherche/banques/PCC/）に頼めば有償で送付してもらえる．しかし，この株は均一でなく運動性があり，グルコース感受性なので，光合成の研究にはあまり使われていない（しばしば〝PCC 株〟といわれる）．光合成の必須遺伝子をノックアウトするためには，ヘテロ増殖に必要な糖などを与える必要がある．このような実験には DuPont の Williams

が開発したグルコース耐性株がよく利用されている[3]．日本でもこの〝グルコース耐性株〟は広く使われており，株名を詳しく指定しない場合は通常この株のことである．この株は公には配布されていないが，国内の関連研究者に頼めば，無償で入手できる．自然形質転換の方法が確立されている（5章1-a参照）が，ゲノム情報が決定された，いわゆる〝かずさ株〟は自然形質転換能を失っている．また近縁種の *Synechocystis* sp. PCC 6714は形質転換もグルコースによる培養も同様にできるが，遺伝情報にはかなりの違いがあり，6803の形質転換用DNAコンストラクトで相同組換はできないと思われる．

### 2.2.2 *Anabaena* sp. PCC 7120

糸状性で，窒素飢餓状態でヘテロシストを形成し，窒素固定をおこなう．絶対光独立栄養で非運動性．接合による形質転換法が確立されており，窒素固定を中心によく研究されている．光合成色素としては，クロロフィル *a*，カロテノイドとフィコシアノビリン，フィコビオロビリンをもつ．培養の光強度に応じた色素組成の調節を行うが，いわゆる補色適応を示すかどうかは不明．この株を使っている研究者はP. Wolkを含めてほとんど*Anabaena* sp.としているにもかかわらず，PCCはしばらく前からその属名を *Nostoc* と変更している．NCBIなど主要なゲノムデータベースはPCCの命名法を尊重しているため，田畑グループが *Anabaena* としてゲノムデータを登録しても[4]，〝*Nostoc* sp. PCC 7120〟として公開しているという異常事態が続いている．ともかく，この株はPCCから入手できるし，国内の関連研究者からも入手できる．また，近縁種に *Anabaena variabilis* ATCC 29413がある．その特徴は *A.* 7120とほぼ同じであるが，フルクトースを利用して非光合成的に生育できるなどいくつか重要なちがいがある．

### 2.2.3 *Nostoc punctiforme* ATCC 29133

糸状性で，窒素飢餓状態でヘテロシストを形成して窒素固定をおこなうが，*Anabaena* とちがって，アキネート（休眠胞子）や運動性のホルモゴニア（連鎖体）も形成する．シダや裸子植物と共生関係を樹立する[5]．光合成色素としては，クロロフィル *a*，カロテノイドとフィコシアノビリン，フィコエリスロビリンをもつ．緑色光でフィコエリスリンを蓄積するいわゆる補色適応（正確には，〝順化〟現象なので，以下，補色順化に統一する）を示す．グルコースによるヘテロ増殖も可能であり，非常に幅広い機能をもっている．接合により形質転換する方法が確立されている（5章1-a参照）．ATCC（American Type Culture Collection）から入手できるが，国内の関連研究者からも入手できる．

### 2.2.4 *Synechococcus elongatus* PCC 6301およびPCC 7942

単細胞性で，絶対光独立栄養増殖する．両者のゲノムは非常によく似ており，ほぼ同一種といえる．しかし，PCC 6301は自然形質転換ができないが，接合による形質転換が可能であり，一方PCC 7942は自然形質転換できる．どちらも細胞破砕が容易で，生化学研究によく使われている．PCCから入手できるが，国内の関連研究者からも入手できる．

### 2.2.5 好熱性シアノバクテリア *Thermosynechococcus elongatus* BP-1および *T. vulcanus* RKN

増殖の至適は57°C．BP-1は別府温泉由来，RKNは湯の峯温泉由来である．BP-1のゲノムは決定されており，RKNの遺伝子はこれに酷似している．単細胞性桿菌で絶対光独立栄養増殖．BP-1はエレクトロポレーションや自然形質転換による形質転換法が確立しており，RKNでも自然形質転換が可能（5章1-a参照）．ともに耐熱性タンパク質をもち，とくに光化学系2や光化学系1複合体の結晶解析に適している．光合成色素としては，クロロフィル *a*，カロテノイドとフィコシアノビリンをもつ．NIES（国立環境研の藻類保存施設）や関連研究者から入手できる．

### 2.2.6 *Tolypothrix* sp. PCC 7601

*Calothrix* sp. PCC 7601, *Fremyella diplosiphon* ともいう．本来窒素飢餓条件でヘテロシストを形成し窒素固定を行うはずだが，PCCによれば，PCC 7601はヘテロシスト形成できない変異体であり，その復帰変異体PCC 7601/1はヘテロシスト形成と窒素固定できるという（ややこしいが，PCCのTandeau de MarsacらがPCC 7601として論文に引用するものは窒素固定できる）．また，一般に *Calothrix* 属の糸状体は円錐状の形態をとるのに対し，本株はむしろ *Nostoc* や *Anabaena* などと似た一様な糸状体を形成するので，*Tolypothrix* の方が妥当な属名といえる．どちらにしても，本株は赤色光でフィコシアニンを蓄積し，緑色光でフィコエリスリンを蓄積する典型的な補色順化を示すことで有名である．D. Kehoe（米・インディアナ大）グループは，この株由来で糸状体を形成する細胞数が数個にまで減少した突然変異体（SF33という）を用いて補色順化の研究を進めており，ゲノム研究も進行中であるが，歴史的な経緯から *Fremyella diplosiphon* と呼んでいる．どちらも形質転換できる．*T.* PCC 7601はPCCから，*F. diplosiphon* はD. Kehoe（米・インディアナ大）などの研究者から入手できる．

### 2.2.7 *Microcystis aeruginosa*

淡水性で湖沼で大量発生してアオコを生成する．強力な肝毒性をもつミクロシスチンを合成する．ゲノムが決定されており，自然形質転換も報告されているが効率は低い．

### 2.2.8 *Gloeobacter violaceus* PCC 7421

チラコイド膜をもたず，細胞膜にフィコビリソームや光化学系が存在し，光合成を行う．そのため，培養液のpH が光合成に大きな影響を与えるというが，生理学的な研究は少ない．系統的にもっとも古く分岐した原始的な種である．絶対光独立栄養増殖性．光合成色素としては，クロロフィル *a*，カロテノイドとフィコシアノビリン，フィコエリスロビリンをもつ．PCC から入手できるが，国内の関連研究者からも入手できる．形質転換の報告はない．

### 2.2.9 *Prochlorococcus* 類

海洋性で，クロロフィル *a* をもたず，ジビニルクロロフィル *a* とジビニルクロロフィル *b*，カロテノイドをもち，フィコビリンをほとんどもたない．世界中の海洋に広く分布し，生態学的に重要な種である．多数の培養株が樹立されており，その多くのゲノムも決定されているが，どれも形質転換法は確立されていない．国内では扱っている研究者が少ないので，多数の培養株を保有しているMassachusetts Institute of Technology Cyanobacteria Culture Collection (Sallie W. Chisholm) から入手するのがよい．

### 2.2.10 海洋性 *Synechococcus* sp.

*Prochlorococcus* 類と近縁で，様に世界中の海洋に広く分布している．生態学的には沿岸性から大洋性まで多様な種が記載・単離されている．光合成色素として，クロロフィル *a*，カロテノイド，フィコシアノビリン，フィコエリスロビリンのほかに，フィコウロビリンをもつこともある．青色光でフィコウロビリンの蓄積が誘導される新規の補色順化を示すものもいる．WH 8102 株などでは形質転換法が報告されているが，例数が少ない．国内では扱っている研究者が少ないので，多数の培養株を保有しているWoods Hole Oceanographic Institution (WHOI) Cyanobacteria Culture Collection (John B. Waterbury)から入手するのがよい．

### 2.2.11 *Cyanophora paradoxa*

灰色藻．プラスチドにペプチドグリカンをもち，系統的にもっとも原始的な真核生物である．NIES 547 株はNIES（国立環境研）から入手できる．また，CCMP329 株のゲノムプロジェクトが進行しており，EST データベースもアクセスできる（http://tbestdb.bcm.umontreal.ca/）．これらの株は同一起源というが，配列に明らかなちがいがあるので別の株である．形質転換の報告はまだない．

### 2.2.11 その他のシアノバクテリア

このほかにも，海洋性で窒素固定を行うがヘテロシストを形成しない *Trichodesmium* や *Cyanothece*, *Crocosphaera*，また，食用として注目されている *Arthrospira platensis*（いわゆる〝スピルリナ〟）などもゲノムとポストゲノム研究が進んでいる．*Trichodesmium* は特有の赤潮を発生させることでも有名である．これらは *Arthrospira* を除いては，まだ形質転換は報告されていない．*A. platensis* IAM-135 は NIES から入手できるが，他の株は海外の研究者から入手する必要がある．

これらの代表的な株のほかにも，多数のシアノバクテリアが株保存施設に保存されている．日本では，国立環境研（NIES）がほぼ一手に収集，保存，配布している．また，野外からシアノバクテリアを新たに単離・無菌化することも容易である．後述する BG11 培地などは汎用培地として多くのシアノバクテリアが増殖でき，しかも無機培地のため雑菌はあまりよく増殖できないためである．自然界から単離されたばかりの株は多様な表現型（糸状菌体 trichome の分岐，内生胞子 baeocyte の形成など）や環境応答（補色順化や光屈性，多様な共生など）を示すことが知られており，興味深いものが多い．しかし，これらの株を研究材料にするときには，上記の扱いやすい株と比べてさまざまな問題に遭遇する可能性がある．たとえば，制限系が発達しているなどの理由で形質転換ができないことも多い（5 章 1-a 参照）．また，陸生の種は多糖類を分泌し凝集塊を形成し液体培養がむずかしいもの，オリゴトロフで増殖速度が極端に遅いもの，細胞の外に厚い鞘をもち無菌化が難しいものなども多い．しかし，シアノバクテリアが生態学的に重要であるため，実に多様な種が研究の対象となっており，他の細菌類と比べても特異な状況といえる．

### 2.2.12 株名の規則

最後に，光合成研究者にはあまり知られていない株の名前の規則について述べる．株の命名法では一般に PCC や NIES などの保存施設の名前と番号がつけられるが，その株名はその施設から直接譲渡された場合のみ使用できるが，これを第 3 者に配布してはいけない．もしくは配布されたものには新たな株名をつけなければならない．例を挙げると，世の中で研究発表されている *Synechocystis* sp. PCC 6803 の大半は，本来はそのように名乗ることは許されないものである．この規則は，株の培養，維持の間に突然変異や培養時の形質の選択などが起

こることによる混乱を避けるためであるが，研究者のコミュニティが発達しているシアノバクテリアの分野では，この規則に基づいて別の名前をつけるとむしろわかりにくくなる．さらに皮肉なことに，世界中でもっとも広く使われているグルコース耐性株は PCC 株から直接に由来したものではなく，おそらく同じ起源の ATCC 27184 由来と考えられる．このような事態にもかかわらず，PCC 6803 の名前で広く流通していることを PCC が放置しているのは，その宣伝効果を考えてのことかもしれない．

## 2.3 株保存施設

PCC：Pasteur Culture Collection（仏），シアノバクテリアの株保存の老舗．属名，type strain などを保持し更新している，多様な種，確かな株の品質維持では定評があり，GenBank の生物名の根拠となっている．

NIES：国立環境研究所，シアノバクテリアや藻類を広く収集しており，日本の株保存の中核組織である．水の華を引き起こす淡水性の *Microcystis* などをとくに多く収集している．

ATCC：American Type Culture Collection（米国），UTEX，CCAP など多数の施設がある．ホームページなどで株を請求すると，スラントなどで送られてくるが，通常は有償である．新たな株の培養は意外と難しいもので，送られてきた細胞が増殖しないこともあるが，すぐにクレームをつければ再送付してくれるはずである．

## 2.4 シアノバクテリアの培地と培養

シアノバクテリアの培地は多数報告されているが，おおまかには栄養塩がリッチな BG11，これから窒素を除いた $BG11_0$，やや貧栄養な AA 培地，海洋性の種を培養する培地などがある．

### 2.4.1 BG11 培地

下記の BG11 培地は *Synechocystis* だけでなく，*Anabaena* や *Synechococcus*，*Thermosynechococcus* などの多くのシアノバクテリアがよく増殖する．

［ストック液］

| | | |
|---|---|---|
| Ⅰ液 | Ferric ammonium citrate | 0.3 g |
| | $Na_2EDTA \cdot 2H_2O$ | 0.05 g |
| | $ddH_2O$[注1] | 100 mL |

[注1] $ddH_2O$: deionized and distilled water

| | | |
|---|---|---|
| Ⅱ液 | $NaNO_3$ | 30 g |
| | $K_2HPO_4$ | 0.78 g |
| | $MgSO_4$ 無水 | 0.73 g |
| | $ddH_2O$ | 1 L |
| Ⅲ液 | $CaCl_2$ 無水 | 1.43 g/100 mL |
| Ⅵ液 | $Na_2CO_3$ | 2 g/100 mL |

A 6 液（微量元素液）

| | |
|---|---|
| $H_3BO_4$ | 2.86 g |
| $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ | 1.81 g |
| $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ | 0.22 g |
| $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ | 0.08 g |
| $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ | 0.021 g |
| 濃硫酸 | 1 droplet |
| $Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ | 0.0494 g |
| $ddH_2O$ | 1000 mL |

緩衝液 1M TES-KOH（pH 7.0–8.2）

［培地の作製］

プレートの場合：Ⅰ液：2 mL/Ⅱ液：50 mL/Ⅲ液：2 mL/Ⅵ液：1 mL/A6 液：1 mL/1M TES-KOH：5 mL/チオ硫酸ナトリウム 3 g/バクトアガー15 g/純水：939 mL＝計 1000 mL

＊アガーのみ別途オートクレーブする．アガーは，バクトアガー（Difco 社）を使用する．他社のものでは生育が遅くなる．プレートでは，チオ硫酸ナトリウムに増殖の促進効果があるが，液体では多くの場合効果がない．

液体培地の場合：Ⅰ液：2 mL/Ⅱ液：50 mL/Ⅲ液：2 mL/Ⅵ液：1 mL/A6 液：1 mL/1M TES-KOH：20 mL/純水：924 mL＝計 1000 mL

液体培地はオートクレーブ後，室温保存できるが，沈澱物を生じる．後で小分けにする場合は，よく混ぜて行う．沈澱は不溶性の鉄の生成によるもので，マイクロアレイ解析で鉄飢餓応答遺伝子が発現誘導されていることがよくある．Ⅰ液を別途オートクレーブすれば避けられる．

［培養の一般的注意］

液体培地に通気する気体の無菌化には，青梅綿（脱脂していないもの）を約 5 cm くらいかたく詰めた綿濾管（乾熱滅菌），または滅菌用フィルタ（ガス用，孔径 0.2 μm）を使用する．

プレート培養では生育が遅いので，空気循環しているインキュベータ内に放置すると，雑菌が混入することがある．一方，パラフィルムを巻けば雑菌の混入は防げるが，増殖は極端に遅くなり，高密度の増殖は期待できない．私たちは空気の循環から遮断する透明なプラスチックの箱に入れて培養している．この方法では，増殖は正常でしかもコンタミしない．また，箱内に炭酸ナトリウム溶液を一緒に入れておいて，プレートの乾燥と $CO_2$ の欠乏に対処している．

[凍結保存]

ジメチルスルホキシド（DMSO，最終 5 %）を含む BG11 培地に細胞を懸濁し，スクリューキャップのチューブに入れて，−85℃のフリーザーで保存する．なお，液体窒素中で保存する方がよいともいうが，液体窒素はチューブ内に入るため，雑菌が混入する可能性がある．

[*Synechocystis* sp. PCC 6803 の培養]

至適温度約 34℃．白色蛍光灯などによる連続光照射する．光強度は，約 50–100 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$．液体培地の場合は，炭酸ガス（1–3%）を通気すると増殖は速くなり，最終到達濃度も高くなる．倍加時間は約 8 時間だが，単なる振盪培養では．約 24 時間以上．プレートでは，数日で濃い青緑色に増殖する．プレートでの増殖には数日以上要するので，寒天培地が乾燥したり．蓋に水滴がつかないように注意する．なお，保存にはパラフィルムでシールするとよいが，パラフィルムは増殖を阻害するので，培養中はシールしない．グルコースを添加すると生育を改善できることが多いが，培養が古くなると死滅しやすくなるという欠点もあるので，株の維持にはあまり薦められない．培養に使用する薬剤については，表 1 に示す．

[*Thermosynechococcus elongatus* BP-1 および *T. vulcanus* RKN の培養]

培養温度の至適は 57℃であるが，形質転換のスクリーニングや変異体の培養は 45℃で行うのがよい．生育の温度範囲は約 30℃〜59℃で，室温以下の温度では，低温障害によって死滅しやすいので注意が必要である．また，30℃以上の温度でも，低めの温度では光阻害が起こりやすい．なお，ある程度培養させたプレートを室温に保存することは可能であり，DMSO を添加して凍結保存することもできる．

### 2.4.2 $BG11_0$ および AA 培地

窒素源を含まない培地での培養は，窒素固定するシアノバクテリアの維持には必須である．PCC の株リストには，「窒素固定をするはずだができない」などと記載された株が多いが，これらは通常の BG11 培地などで維持される間に生じた変異体である．

[培地の作製]

$BG11_0$ 培地は，窒素源を含まない BG11 培地である．上記の BG11 培地から $NaNO_3$ を除いて作製する．*Anabaena* や *Nostoc* など窒素固定するシアノバクテリアの培地としてよく使われている．一方，Allen and Arnon（AA）培地は，窒素源を含まないやや貧栄養の培地である．これを $ddH_2O$ によって 4 倍に希釈したものが AA/4 培地である．

まず，以下の＋Pi 溶液と−Pi 溶液を作製する．

①＋Pi 溶液

$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$　28.0 g/500 mL $H_2O$（無水 $K_2HPO_4$ 21.4 g/500 mL でもよい）

オートクレーブし，4 ℃で保存．

②−Pi 溶液

以下の (a)〜(d) の溶液を 1：1：1：1 で混合し，4 ℃で保存．

**表 1**：*Synechocystis* 培養におけるグルコースと薬剤のストック液

| | ストック液 | 最終濃度 | 特徴 |
|---|---|---|---|
| グルコース | 2 M[注2] | 5 mM | 呼吸基質 |
| DCMU | 20 mM/EtOH | 10 $\mu$M | 光合成系 2 の阻害剤 |
| カナマイシン | 20–50 mg $mL^{-1}$[注2] | 20 $\mu$g $mL^{-1}$ | Tn5 由来 |
| スペクチノマイシン | 40 mg $ml^{-1}$[注2] | 20 $\mu$g $mL^{-1}$ | *aadA*，ストレプトマイシン耐性もあり |
| クロラムフェニコール | 50 mg $mL^{-1}$EtOH | 25 $\mu$g $mL^{-1}$ | pACYC184 由来 |
| エリスロマイシン | 100 mg $mL^{-1}$EtOH | 20 $\mu$g $mL^{-1}$ | 黄色ブドウ球菌由来 |

[注2] 0.2 $\mu$m フィルターで濾過滅菌する

(a) $MgSO_4 \cdot 7H_2O$　20 g/500 mL $H_2O$（オートクレーブ，4 ℃で保存）
(b) $CaCl_2 \cdot 2H_2O$　6 g/500 mL $H_2O$（オートクレーブ，4 ℃で保存）
(c) NaCl　20 g/500 mL $H_2O$（オートクレーブ，4 ℃で保存）
(d) Microelement stock[注3]（オートクレーブしない，4 ℃で保存）

液体培地を作る場合，970 mL の $H_2O$ に，＋Pi 溶液を 25 mL，－Pi 溶液を 6.25 mL を加え，オートクレーブする．＋Pi 溶液と－Pi 溶液は沈殿を形成するので，先に混ぜないこと．また，プレートを作製する場合は，10 g のバクトアガーを 1 L の AA 培地に加えてオートクレーブする．プレートはパラフィルムで封をし，4 ℃で保存する．

### [*Nostoc punctiforme* ATCC 29133 の培養]

24～31℃の範囲で培養する．通気培養・振盪培養いずれも可能だが，細胞が増殖すると凝集して沈殿を形成しやすい．AA 培地や窒素源を除いた $BG11_0$ 培地，AA プレートで増殖する．BG11 培地や，窒素を加えた AA 培地では増殖が速くなるが，長期間培養を続けると窒素固定能が低下する可能性がある．Jack Meeks らは *Nostoc* の液体培養には AA 培地を 4 倍に希釈して用いている（AA/4 培地）．

### 2.4.3 *Cyanophora* の培養方法

【C 培地】

| | |
|---|---|
| $Ca(NO_3)_2 \cdot 5H_2O$ | 15 mg |
| $KNO_3$ | 10 mg |
| $Na_2$ $\beta$-glycerophosphate$\cdot 5H_2O$ | 5 mg |
| $MgSO_4$ | 2 mg |
| Vitamin $B_{12}$ | 0.01 $\mu$g |
| Biotin | 0.01 $\mu$g |
| Thiamine HCl | 1 $\mu$g |
| PIV metals | 0.3 mL |
| Tris (hydroxymethyl) aminomethane | 50 mg |
| Distilled water | 99.7 mL |
| pH 7.5 | |

【PIV metals】

| | |
|---|---|
| $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ | 19.6 mg |
| $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ | 3.6 mg |
| $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ | 2.2 mg |
| $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ | 0.4 mg |
| $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ | 0.25 mg |
| $Na_2EDTA \cdot 2H_2O$ | 100 mg |
| Distilled water | 100 mL |

*Cyanophora paradoxa* NIES 547 は液体の C 培地を用いて 25℃で 1％　$CO_2$ を含む空気を通し，白色光を照射して培養する．光強度は 20～30 $\mu E\ m^{-2}\ sec^{-1}$ 程度．増殖速度が遅いので，雑菌の混入がないように留意する．混入すると，さらに増殖は遅くなり，最終の細胞密度も低下する．なお，寒天培地では増殖しない．また，凍結保存もできないと思われる．

### [細胞の回収とシアネル（プラスチド）の単離]

以下の方法で穏和に細胞を破砕する[6]．

1．培養液を 2,000×g で 10 分間遠心し，細胞を回収する．
2．回収した細胞を等張の HEMS buffer を用いて 2 回洗浄．
3．細胞を HEMS buffer で再懸濁したものを，低張の HEM buffer で 10 倍希釈する．これによって浸透圧により細胞膜が壊れる．
4．2,500 g で 10 分間遠心し，シアネルを回収する．

※この方法では遠心によって，壊れた細胞膜も一緒に回収されてしまう．タンパク質の輸送実験などに用いる高純度のシアネルを単離するには，この標品をさらにパーコールなどの密度勾配遠心分離法によって精製する．

【HEMS buffer】

50 mM HEPES-NaOH（pH 7.5）
2 mM EGTA

---

[注3] 以下の試薬を溶解して混ぜて調製する．

| | |
|---|---|
| 1）Double distilled water | 545 mL |
| 2）$H_3BO_3$(boric acid) | 286 mg |
| 3）$MnCl_2 \cdot 4H_2O$ | 180 mg |
| 4）$MoO_3$（純度 85％） | 18.0 mg |
| （又は $Na_2Mo4 \cdot 2H_2O$　純度 99％，30.5 mg） | |
| 5）$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ | 22.0 mg |
| 6）$CuSO_4 \cdot 5H_2O$ | 7.9 mg |
| 7）$CoCl_2 \cdot 6H_2O$ | 4.0 mg |
| 8）$NH_4VO_3$($NH_4^+$metavanadate) | 2.3 mg |
| 9）Fe-EDTA 溶液[注4] | 80 mL |

[注4] Fe-EDTA 溶液の作製法
2.6 g の KOH を 93 mL の $H_2O$ に溶かし，さらに 10.2 g の $Na_2EDTA \cdot 2H_2O$ を加えて溶かす．そして，6.9 g の $FeSO_4 \cdot 7H_2O$（または $Fe_2(SO_4)_3 \cdot nH_2O$）を 182 mL の $H_2O$ に溶かす．二つの溶液を混ぜ合わせると濁りが除かれる．フィルター（Millipore，孔径 0.45 $\mu$m）を通した空気を約 4 時間通気する．溶液が褐色から，赤ワイン色に変化する．その後，4 ℃で保存する．

10 mM NaCl
1 mM $MgCl_2$
0.5 M sucrose

【HEM buffer】
50 mM HEPES-NaOH（pH 7.5）
2 mM EGTA
10 mM NaCl
1 mM $MgCl_2$

## 文献


1）T. Kaneko, S. Sato, H. Kotani, A. Tanaka, E. Asamizu, Y. Nakamura, N. Miyajima, M. Hirosawa, M. Sugiura, S. Sasamoto, T. Kimura, T. Hosouchi, A. Matsuno, A. Muraki, N. Nakazaki, K. Naruo, S. Okumura, S. Shimpo, C. Takeuchi, T. Wada, A. Watanabe, M. Yamada, M. Yasuda, & S. Tabata, DNA Res. **3** (1996) P. 109.

2）M. Ikeuchi, & S. Tabata, Photosynth. Res. **70** (2001) P. 73.

3）J. G. K. Williams, Methods Enzymol. **167** (1988) P.766.

4）T. Kaneko, Y. Nakamura, C. P. Wolk, T. Kuritz, S. Sasamoto, A. Watanabe, M. Iriguchi, A. Ishikawa, K. Kawashima, T. Kimura, Y. Kishida, M. Kohara, M. Matsumoto, A. Matsuno, A. Muraki, N. Nakazaki, S. Shimpo, M. Sugimoto, M. Takazawa, M. Yamada, M. Yasuda, & S. Tabata, DNA Res. 8 (2001) P.205.

5）J. C. Meeks, E. L. Campbell, M. L. Summers, & F. C. Wong, Arch. Microbiol. **178** (2002) P.395.

6）H. Koike, M. Shibata, K. Yasutomi, Y. Kashino, & K. Satoh, Photosynth. Res. **65** (2000) P.207.

# 3．クラミドモナス

福澤　秀哉[1)]，久保　雄昭[1)]

緑藻クラミドモナス（和名，コナミドリムシ）は最も単純な細胞構造を持つ真核光合成生物であることから，古くから光合成研究に用いられてきた[1,2)]．2007年秋，日米欧の研究者の協力によってJGI（http://genome.jgi-psf.org/）から雌株ゲノムのドラフト配列が公開された[3)]．細胞の形質転換法の確立やレポーター遺伝子の整備も進み，高等植物（シロイヌナズナ）と原核光合成微生物（シアノバクテリア）との間の橋渡しをするモデル生物として利用されている．光合成を行ない鞭毛によって泳ぎ回るこのユニークな単細胞性の緑藻（鞭毛虫）には，太古の原始細胞が植物細胞や動物細胞に分岐した進化のヒントが秘められている．ここでは，クラミドモナスの特徴について概説するとともに，クラミドモナス実験室株の入手法や培養法について述べる[4)]．

## Resources and culture of the green algae *Chlamydomonas reinhardtii*

Hideya Fukuzawa, Takeaki Kubo

*Chlamydomonas reinhardtii* is a biflagellate green alga, which has the simplest system in photosynthetic eukaryote. Moreover, the draft genome sequence of *Chlamydomonas* that has features similar to both plants and animals has been released in 2007. In this chapter, we introduce the characteristics of this unicellular organism and how to obtain and maintain the laboratory strains.

### 3.1　クラミドモナスの特徴

クラミドモナス *Chlamydomonas reinhardtii* は分子遺伝学的手法を取りうる唯一の緑藻で，学術雑誌Cellに〝Green Yeast〟と紹介され[5)]，動植物の特徴を兼ね備えている（図1）．クラミドモナスは雌雄異株で $mt^+$ と $mt^-$ という2つの性（接合型）に分かれており，どちらも有性生殖と無性生殖の両方の生活環を持つ（図2）．葉緑体ゲノム（203 kb）が最初に発見され[6)]，その形質転換が最初に成功した生物種である[7)]．現在では核（約120 Mb，n＝17）とミトコンドリアを含めた3つのゲノムすべてについて遺伝子導入が可能となっており，次のような特徴を持つ[8)]．

① 光合成，呼吸，生殖，（母性）遺伝，鞭毛運動などの生命現象に関わる変異株の単離が容易である．
② 葉緑体，チラコイド膜などの細胞構成成分の単離が比較的容易である．
③ 培養が容易で，世代時間が約5時間と短い．
④ 雄雌株を掛け合わせ，四分子を使った遺伝解析ができる．
⑤ ドラフトゲノム配列とEST配列が公開され，ゲノム地図が整備されている．
⑥ 核，葉緑体でそれぞれ機能するレポーター遺伝子（ARS[9)]，Luciferase[10)]，GFP[11)]など）や形質転換体の選抜に使用可能な薬剤耐性マーカー遺伝子（ゼオシン，パロモマイシン，ハイグロマイシンなど）が使える．
⑦ 多細胞体制をとるボルボックスやゴニウムやプレオドリナなどの群体性藻類と進化上近縁であり，クラミドモナスの比較研究から多細胞生物の起源を示唆する



**図1**：クラミドモナスの光学顕微鏡写真
クラミドモナスは等長の二本の鞭毛で遊泳し，一つの大きな葉緑体で光合成を行う真核性緑藻である．葉緑体の中に見える構造体は「ピレノイド」と呼ばれる構造体で，炭酸固定の場になっている（矢印）．スケールバーは5 $\mu$m を示す．

1）京都大学大学院生命科学研究科遺伝子特性学分野

研究も進められている．また，炭酸固定を制御する因子[19]や，ピノレン酸（松の実に多く含まれる脂質）の生合成に関わる脂肪酸不飽和化酵素[20]など多様な研究に利用されている．

現在，実験室で利用されている株の多くは，1945年にG. M. Smith博士が米国マサチューセッツ州のAmherstのジャガイモ畑で採取された雌雄一対の株に由来する[4]．

## 3.2 ゲノムプロジェクト

クラミドモナスのゲノムサイズは約120 Mbpで，その13倍をカバーするショットガン配列データから1,557スキャフォルドの配列が米国DOE-JGIから公開された[3]．配列はウェブサイト上で閲覧やBLAST検索も可能である（http://genome.jgi-psf.org/Chlre3/）．このショットガンゲノム解析には，雌株CC-503（cw92，mt＋）が用いられた．このゲノムについては，遺伝マーカーの連鎖解析から染色体数は17本と推定されていたが，74本のスキャフォルドが17本の染色体を形成し，ゲノムの78%に相当する95 Mbpの領域をカバーしている．EST情報と遺伝子予測プログラムを用いて，15256種の蛋白質コード領域が推定され，そのうち56%の8,631種の発現がEST情報より確認されている．雄株については，日本でC-9株を標準株として，ゲノムライブラリーならびにEST解析が進められている[12,13]．これまでに，低$CO_2$ストレス[14]，強光ストレス[15]，配偶子誘導[16]，概日リズム[17]，接合子形成[18]に関する遺伝子が，cDNAアレイを用いて同定されている．特にこのcDNAアレイ作製には，多くの国内クラミドモナス研究者と「かずさDNA研究所」が協力した．現在も「クラミドモナス研究会」で活発な情報交換が行われている．

染色体上の遺伝子地図と物理地図，さらにゲノム配列のデータベースの充実によって，目的の遺伝子を単離するポジショナルクローニングが可能になりつつある．ゲノムライブラリー，ESTライブラリーの標準化が進められており，簡便な形質転換法が確立されている（第5章-2参照）ので，他の生物を扱っている研究者も容易に利用できる環境が整ってきた．

## 3.3 株ならびにプラスミドDNA等の入手方法

クラミドモナスの実験室株（野生株ならびに突然変異株），ならびに各種有用プラスミドDNAは，複数の保存機関から入所可能であるが，米国のクラミドモナスセンターが最も規模として大きい．ウェブサイト（www.chlamy.org）で情報を検索することができ，有償で分譲を受けることができる．EST解析に用いられた野生型雄株C-9（mt－）は，文部科学省ナショナルバイオリソースプロジェクトで支援を受けて国立環境研究所の微生物系統保存施設（http://mcc.nies.go.jp/）でNIES-2235株として保存されており入手できる．ESTクローンは，かずさDNA研究所（http://est.kazusa.or.jp/en/plant/chlamy/EST/）から入手できる．また，C-9株のゲノムクローンと完全長cDNAクローンについては，京都大学（http://chlamy.pmb.lif.kyoto-u.ac.jp/）から公開される予定である．

## 3.4 培地と培養法

クラミドモナスは，液体培地，寒天培地のいずれでも培養が可能である．標準的な培地としては酢酸を炭素源として含むTAP培地と，独立栄養培養に適した最小栄養HSM培地がある[4]．長期で保存するときには，斜面TAP培地を作製し18°Cで保存が可能である（通常2－3ヶ月程度）．また液体窒素中での凍結保存技術も確立されつつある（www.chlamy.org/methods/）．ここでは，標準的な培地であるTAPならびにHSM培地（液体・プレート）の作製法と培養法，クラミドモナス保存用のスラント培地について述べる．

**[準備]**

・TAP培地

| | |
|---|---|
| TAP塩ストック液 | 10 ml |
| リン酸ストック液 | 1 ml |
| Hutnerトレースエレメント | 10 ml |
| （寒天末 | 15 g*2） |
| ＋蒸留水 | 1 L |

任意の容量に分注後，オートクレーブする．

・TAP塩ストック液

| | |
|---|---|
| $NH_4Cl$ | 40 g |
| $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$ | 10 g |
| $CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$ | 5 g |
| Tris | 242 g |
| 酢酸 | 100 ml |
| ＋蒸留水 | 1 L |

・リン酸ストック液

| | |
|---|---|
| $K_2HPO_4$ | 10.8 g |
| $KH_2PO_4$ | 5.6 g |
| ＋蒸留水 | 100 ml |

・Hutner トレースエレメント

| | |
|---|---|
| $Na_2$-EDTA | 5.0 g |
| $ZnSO_4 \cdot 7\,H_2O$ | 2.2 g |
| $H_3BO_3$ | 1.14 g |
| $MnCl_2 \cdot 4\,H_2O$ | 0.51 g |
| $CoCl_2 \cdot 6\,H_2O$ | 0.16 g |
| $CuSO_4 \cdot 5\,H_2O$ | 0.16 g |
| $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4\,H_2\,0$ | 0.11 g |
| $FeSO_4 \cdot 7\,H_2O$ | 0.50 g |
| KOH | 1.6 g |
| ＋蒸留水 | 1 L |

オートクレーブして室温に 2 日ほど保存すると，緑色から赤紫色に変色する．

・HSM 培地

| | |
|---|---|
| No. 1 ストック溶液 | 10 ml |
| No. 2 ストック溶液 | 10 ml |
| Hutner トレースエレメント | 10 ml |
| (寒天末 | 15 g*2) |
| ＋蒸留水 | 1 L |

2 M KOH で pH 7.0 に調整する．ただし，培地の pH 変化を抑えたい場合は，終濃度 20 mM MOPS バッファー (pH 7.2) を添加する．任意の容量に分注した後，オートクレーブ処理する．

・No. 1 ストック溶液

| | |
|---|---|
| $NH_4Cl$ | 50 g |
| $MgSO_4 \cdot 7\,H_2O$ | 2.0 g |
| $CaCl_2 \cdot 2\,H_2O$ | 1.0 g |
| ＋蒸留水 | 1 L |

・No. 2 ストック溶液

| | |
|---|---|
| $K_2HPO_4$ | 144 g |
| $KH_2PO_4$ | 72 g |
| ＋蒸留水 | 1 L |

## A．TAP 培地での前培養

1）スラントまたは TAP 寒天培地上に生えているクラミドモナスのコロニーを，5 ml の TAP 培地を分注した試験管（例えば，14 ml 容のポリプロピレンチューブ），または 20〜30 ml の TAP 培地を分注した 100 ml 容の三角フラスコに無菌的に接種する（図 2-A）．

2）100〜150 $\mu$mol·m$^{-2}$·sec$^{-1}$ の光照射下で静置培養する．細胞は 3 〜 4 日ほどで対数増殖期に達する．

3）常に実験に使用できる前培養溶液として 7 日〜10 日毎に新しい TAP 培地に植え換える．

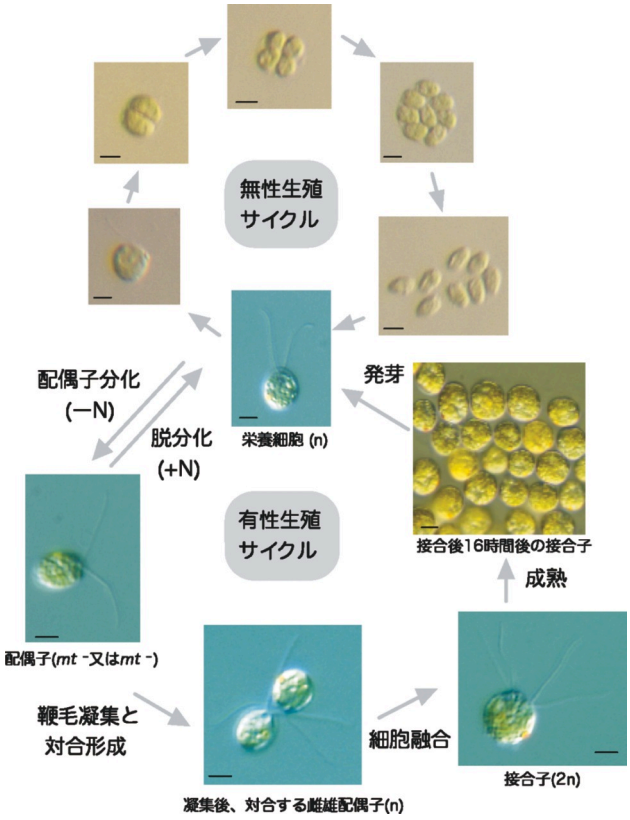



**図 2**：クラミドモナスの生活環
クラミドモナスは雌雄の性（接合型）をもつ栄養細胞がそれぞれ独立して無性分裂を繰り返す無性生殖サイクルと，窒素源枯渇によって誘導される配偶子分化，両配偶子による鞭毛凝集，接合子形成を経て 2 セットの雌雄娘細胞を形成する有性生殖サイクルを持つ．スケールバーは 5 $\mu$m を示す（文献 2 を改変）．

## B．TAP プレートでの培養

1）スラントまたは TAP 寒天培地上に生えているクラミドモナスのコロニーを，滅菌した白金耳，ニクロム線または爪楊枝で画線培養する．

2）プレートを逆さまにして 100〜150 $\mu$mol·m$^{-2}$·sec$^{-1}$ の光照射下で培養する．3 〜 4 日ほどで寒天プレート上にシングルコロニーを形成する（図 2 B）．

3）サージカルテープを巻いて乾燥を防ぎ，5 〜20 $\mu$mol·m$^{-2}$·sec$^{-1}$ の比較的暗い場所で保存する．

### C．TAP（液体）での培養

1）乾熱滅菌処理した 100 ml 三角フラスコに TAP 培地を 50 ml 分注する．
2）TAP 液体培地で前培養していたクラミドモナス培養液を 1/100〜1/50 希釈で接種する．
3）約 80 rpm で攪拌しながら，100〜150 $\mu$mol・m$^{-2}$・sec$^{-1}$ の光照射下で培養する． 3〜4 日で対数増殖期に達する（図 3 C）．

### D．スラント培地でのクラミドモナス細胞の長期保存

1）TAP（+1.5%の寒天末）に終濃度 0.4%（W/V）の割合で Yeast Extract（DIFCO 社）を加え，湯浴させて溶解させた後，スクリューキャップ付きガラス試験管に 5 ml 分注し，オートクレーブ処理する．
2）オートクレーブ後，固まる前にガラス試験管をチューブラックに立て，傾斜をつけてスラント培地を固化させる．
3）寒天プレート上のクラミドモナスのコロニー，あるいは前培養の TAP 培地から白金耳を用いて，スラント培地に画線培養の要領で接種する（図 3 A）．
4）100〜150 $\mu$mol・m$^{-2}$・sec$^{-1}$ の光照射下で培養し，スラント培地上に細胞が生えてきたら，弱光下（5〜20 $\mu$mol・m$^{-2}$・sec$^{-1}$），18℃で培養する．
5）スラント培地上の細胞の様子を観察しながら， 2〜3 ヶ月に一度植え換えを行う．

### E．HSM（液体・寒天）培地での培養

1）通気用シリコンチューブと培養栓〔例えばシリコセン（信越ポリマー株）〕付の大試験管を乾熱滅菌処理し，これに HSM 培地を 50 ml 分注する．
2）TAP 培地で前培養していたクラミドモナス培養液を 1/100〜1/50 希釈で接種する．
3）おだやかに通気しながら，100〜150 $\mu$mol・m$^{-2}$・sec$^{-1}$ の光照射下で培養する． 3〜4 日で対数増殖期に達する（図 3 C）．

〈**注意**〉照度を下げて前培養時した細胞を植え替えて，急に照度を上げると細胞が白化する場合があるので，照度は測定して管理する必要がある．

〈**謝辞**〉貴重なコメントを頂いた京都大学大学院理学研究科の西村芳樹先生に感謝します．

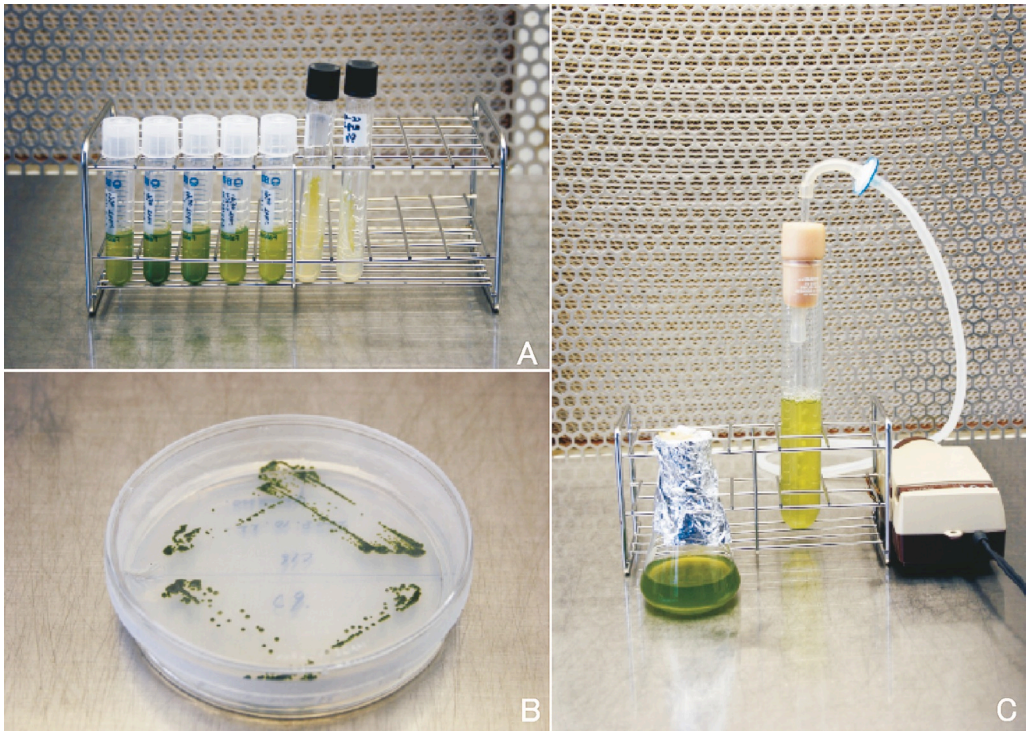



**図 3**：クラミドモナスの培養の様子．
A．クラミドモナス細胞を TAP 培地（5 ml；14 ml 容ラウンドチューブ）に静置培養したものと，長期保存用のスラント培地（スクリューキャップ付きガラスチューブ）で培養したもの．B．クラミドモナス細胞を画線培養した TAP プレート．シングルコロニーを形成する．C．TAP 培地（100 ml 三角フラスコに 20 ml の培養液）での静置培養，ならびに大試験管での通気培養．右は，50 ml の HSM 培地に，滅菌フィルター（直径 25 mm，ポアサイズ 0.2 $\mu$m のシリンジフィルター）を通して通気している．

## 引用文献


1）高橋裕一郎，福澤秀哉，蛋白質核酸酵素（共立出版）**45**（2000）P.1937.

2）福澤秀哉，久保雄昭，山野隆志，蛋白質核酸酵素（共立出版）**53**（2008）P.1133.

3）S. Merchant et al., Science **318** (2007) P.245.

4）E. H. Harris, The *Chlamydomonas* Sourcebook 2nd Ed. (2009) Vol. 1, Academic Press.

5）U. W. Goodwnough, Cell **70** (1992) P.533.

6）R. Sager, & M. R. Ishida, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **50** (1963) P.725.

7）J. E. Boynton, N. W. Gilham, E. H. Harris, J. P. Hosler, A. M. Johnson, A. R. Jones. B. L. Randorph-Anderson, D. Robertoson, T. M. Klein, & K. B. Shark, Science **240** (1988) P.1534.

8）E. H. Harris, Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biol. **52** (2001) P.363.

9）J. P. Davis, D. P. Weeks, & A. R. Grossman, Nuc. Acicd Res. **20** (1992) P.2529.

10）T. Matsuo, K. Onai, K. Okamoto, J. Minagawa, & M. Ishiura, Mol. Cell. Biol. **26** (2006) P.863.

11）M. Fuhrman, W. Oertel, & P. Hegemann, Plant J. **19** (1999) P.353.

12）E. Asamizu, Y. Nakamura, S. Sato, H. Fukuzawa, & S. Tabata, DNA Res. **6** (1999) P.369.

13）E. Asamizu, K. Miura, K. Kucho, Y. Inoue, H. Fukuzawa, K. Ohyama, Y. Nakamura, & S. Tabata, DNA Res. **7** (2000) P.305.

14）K. Miura, T. Yamano, S. Yoshioka, T. Kohinata, Y. Inoue, F. Taniguchi, E. Asamizu, Y. Nakamura, S. Tabata, K. T. Yamato, K. Ohyama, & H. Fukuzawa, Plant Physiol. **135** (2004) P.1595.

15）T. Yamano, K. Miura, & H. Fukuzawa, Plant Physiol. **147** (2008) P.340.

16）J. Abe, T. Kubo, Y. Takagi, T. Saito, K. Miura, H. Fukuzawa, & Y. Matsuda, Curr. Genetics **46** (2004) P.304.

17）K. Kucho, K. Okamoto, S. Tabata, H. Fukuzawa, & M. Ishiura, Plant Mol. Biol. **57** (2005) P.889.

18）T. Kubo, J. Abe, T. Oyamada, M. Ohnishi, H. Fukuzawa, Y. Matsuda, & T. Saito, Plant Cell Physiol. **49** (2008) P.981.

19）T. Kohinata, H. Nishino & H. Fukuzawa, Plant Cell Physiol. **49** (2008) P.273.

20）M. Kajikawa, K. T. Yamato, Y. Kohzu, S. Shoji, Y. Sakai & H. Fukuzawa, Plant Cell Physiol. **47**: 64–73 (2006).

# 4．ゼニゴケの培養法

大和　勝幸[1)]，石崎　公庸[1)]，河内　孝之[1)]

ゼニゴケは，陸上植物の進化を考える上では基部陸上植物の１つとして鍵となる存在である．近年，形質転換法やゲノム情報などの分子生物学的ツールが整備され，実験生物として注目されはじめている．新たなモデル植物としてのゼニゴケの特性を紹介しつつ，その基本的な扱いについて紹介する．

## The basics of cultivating the liverwort *Marchantia polymorpha* L.

Katsuyuki T. Yamato, Kimitsune Ishizaki, Takayuki Kohchi

The liverwort *Marchantia polymorpha* L. is one of the basal land plants that occupies a key position in the evolutionary tree of land plants. This inconspicuous plant is easy to grow, cross, and transform, and its genomic resource is being accumulated, which has made it an emerging model plant. Here we describe basic protocols to culture, cross, and store *M. polymorpha* plants and cultured cells.

## 4.1　ゼニゴケとは

### 4.1.1　進化的位置付け

世界中に広く分布し，日本でも建物の日陰などで比較的容易に見つけることができる．一般には「嫌われ者」のゼニゴケだが，進化的には興味深い生物である．植物は水中で出現した光独立単細胞生物に起源を有し，約４億5000万年前に陸上化を果たしたと考えられている．その後，コケ植物が陸上植物としては最も初期に分岐し，植物の系統において「基部陸上植物」と位置付けられている（図1）．一般には一つの植物群として扱われがちなコケ植物であるが，実際には「タイ類」「セン類」「ツノゴケ類」という，それぞれが４億年を超える進化の歴史をもつ３つの群で構成されている．そして，コケ植物の中でもさらに基部に位置すると考えられているのがタイ類であり[1,2)]，タイ類の代表とも言えるのがゼニゴケ（*Marchantia polymorpha*）である．遺伝子ターゲティングが容易なことで知られるヒメツリガネゴケ（*Physcomitrella patens*）もコケ植物ではあるが，セン類に属する．ゼニゴケは陸上植物の進化を考える上で極めて重要な位置にあり，現在の多様化した陸上植物に見られる様々な現象の理解に大きく貢献すると期待されている．

### 4.1.2　生活環

ゼニゴケの生活環は種子植物のものとは大きく異なり，配偶体，すなわち半数体（n）の状態が大半を占める（図2）．ゼニゴケにおける生殖生長への移行機構は不明であるが，長日条件および遠赤色光照射により促進されることが報告されている[3)]．ゼニゴケは雌雄異株であり，性染色体をもつ（雌，n＝８＋X；雄，n＝８＋Y）．生殖生長相に移行すると雄株は造精器をもつ雄器托を，雌株は造卵器をもつ雌器托を形成する．雄器托に雨などの水がかかると造精器より運動能のある精子が放出される．精子は２本の鞭毛を用いて水中を泳ぎ，周辺の雌株上の造卵器に到達して受精が成立する．受精卵（2n）は体細

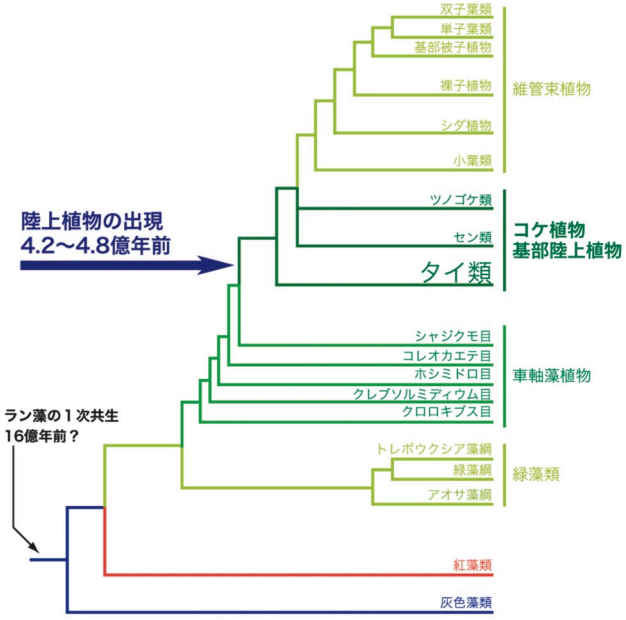



**図1：植物の進化系統樹と陸上化**
ゼニゴケは約4.5億年前に最初に陸上化を果たした植物の現生種であると考えられている（文献[2)]より改変）．

1）京都大学大学院生命科学研究科遺伝子特性学分野

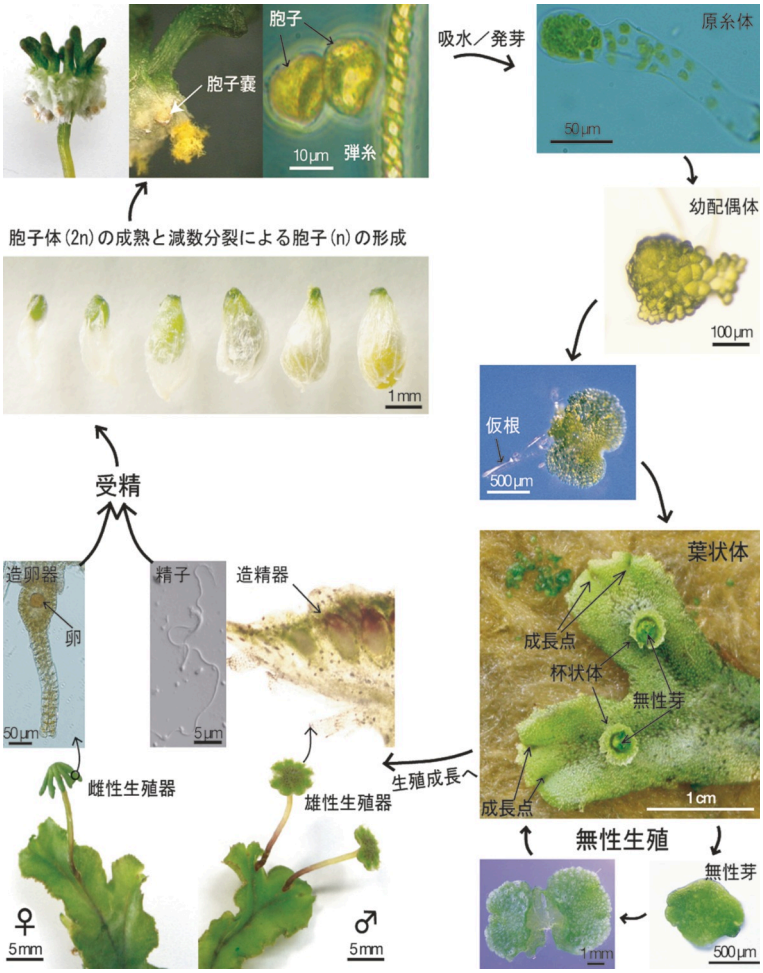



**図 2**：ゼニゴケの生活環
ゼニゴケは，通常は配偶体（n）として存在し，胞子体（2n）である期間は受精後胞子を形成するまでの限られた期間のみである．また，無性生殖でも有性生殖でも増殖することができる．

胞分裂を続けた後，減数分裂を経て半数体の胞子（n）を形成する．胞子は発芽して葉状体へと生長する．葉状体には杯状体と呼ばれる器官が形成され，その中に多数の無性芽が生じる．個々の無性芽は杯状体底部の始原細胞１個に由来し，成長して葉状体となる．無性芽はそれを生じた個体のクローンなので，遺伝的に均一な植物体を容易にかつ大量に得ることが可能である．

### 4.1.3　形態

ゼニゴケの形態は単純であり，栄養生長相では葉状体が主たる器官である（図 2）．生長点は葉状体の先端部に位置し，周期的に二分して特徴的な二叉構造を形成する．ヒメツリガネゴケの茎葉体の葉は１層の細胞層からなるが，ゼニゴケの葉状体には分化した細胞からなる複数の組織層が見られる．葉状体の表面は気室と呼ばれる構造で構成される（図 3）．気室上部は１層の細胞層からなり，中央にガス交換のための気室孔がある．気室孔は気孔と類似しているが，気孔のように開閉することはない．気

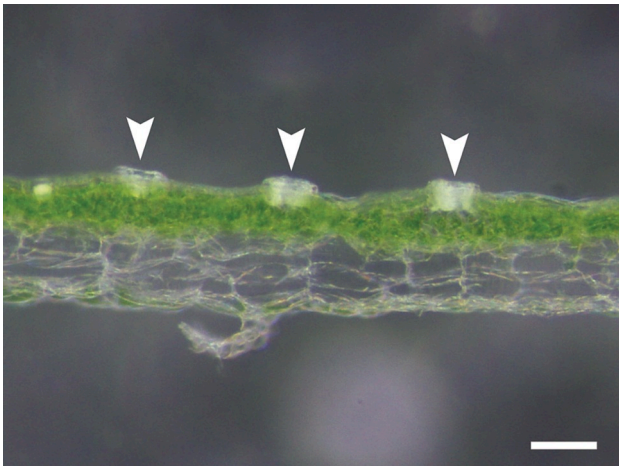


**図 3**：葉状体の断面
葉状体は異なる組織に分化した細胞層で形成されている．表層は気室が占めており，内部には葉緑体に富む細胞が多数存在する．気室には気室孔（矢頭）が存在し，ガス交換を行う．白線は 100 μm を示す．

室内には葉緑体に富む細胞が多数存在し，同化組織を形成している．気室層の下には葉緑体に乏しい大型の細胞層があり，葉状体の裏面には鱗片や仮根が形成されている．生殖器官としては，有性生殖に雌器托および雄器托，無性生殖に杯状体および無性芽を形成する．

#### 4.1.4　ゼニゴケを用いた研究

ゼニゴケは世界各地に分布する身近な植物であったことから，古くから研究され，19 世紀前半からゼニゴケに関する学術論文が発表されている．興味の対象は分類の他，進化，形態形成，光応答，遺伝，二次代謝など多岐にわたる．ゼニゴケを用いた研究のうち植物科学にインパクトを与えたものとして，1986 年の大山らによる葉緑体 DNA 完全解読を挙げることができる[4]．葉緑体ゲノムの全容が明らかになったことで，光合成装置を構成する数多くの因子の存在が示された．また，植物としては初めてミトコンドリア DNA[5] および性染色体 DNA[6] が解読され，陸上植物の進化を考察する上でも鍵となる情報を提供している．

#### 4.1.5　モデル光合成生物としてのゼニゴケ

基部陸上植物であるタイ類は植物の陸上化後最も早く分岐したことから，現生陸上植物の共通祖先がもつ「単純さ」を保持していると考えられる．実際，著者らの研究で，タイ類ゼニゴケにおいて制御系の遺伝子構成が比較的単純であることが示唆されている．例えば，植物の主要な光受容体フィトクロムの遺伝子はシロイヌナズナで 5 個存在するのに対し，ゼニゴケでは 1 個である．シロイヌナズナなどの被子植物では，組織や環境に応じた精巧な制御を行うことができるが，これは制御系遺伝子群の重複によるところが大きい．しかし同時に，遺伝子の重複はその制御系を理解する上で大きな妨げとなる場合が多い．この点で，単純な制御系を備えたゼニゴケは植物における様々な制御系を理解するための優れたモデルとなりうる．

ゼニゴケは実験生物としても適している．まず，生活環のほとんどが半数体の配偶体であるため，変異処理後直ちに表現型を観察することができ，変異体の作出に有利である．また，雌雄異株であるため，除雄などの操作が不要で交配が容易である．有性生殖および無性生殖のいずれでも増殖し，交配による子孫の作成およびクローンの作成・維持が可能である．さらに，遺伝子の機能解析に必要不可欠である形質転換法も確立されている．胞子を発芽させて約 1 週間の組織を用いることで，パーティクルガン法でもアグロバクテリウム法でも核ゲノムへの遺伝子導入が可能である（5.3a 石崎らの項参照）[3,7]．特に後者は 1 度の処理で多数の形質転換体を得ることができ，当代で表現型を観察することができる[7]．また，葉緑体 DNA の形質転換はシロイヌナズナでは困難であるが，ゼニゴケでは培養細胞・植物体を問わず可能である（5.3b 千代田らの項参照）[8]．

昨今のモデル生物に欠かせないリソースとして，ゲノム情報がある．これまでゼニゴケのゲノム情報は，オルガネラ，性染色体および EST に限られていたが，米国エネルギー省 Joint Genome Institute の Community Sequencing Program によりゼニゴケ全ゲノム・ショットガン・シーケンシングが実施されることが 2007 年に決定されている（http://www.jgi.doe.gov/sequencing/why/99191.html）．本稿執筆時点ではパイロット段階であるが，近く本格的に解読作業が開始される予定である．

### 4.2　標準系統

著者らが実験に用いているゼニゴケには培養細胞および植物体があり，いずれの系統も筆者らの研究室より分与している．

#### 4.2.1　培養細胞

熊本大学の小野らにより確立されたもので[9]，ゼニゴケ葉緑体およびミトコンドリア DNA の全塩基配列解読にはこの系統が用いられた[4,5]．増殖能に優れ，均一な細胞を大量に得ることができる．また，他の多くの培養細胞系統と異なり葉緑体が発達しているため，光合成・葉緑体の実験に適している．

#### 4.2.2　植物体

著者らは京都に自生するゼニゴケを採取し，単一の無性芽に由来する標準系統を確立した（表 1）[10]．いずれの系統も無性芽の無菌培養により継代されている．前述の通り，ゼニゴケ葉状体は半数体であるため，いずれの系統も基本的に「純系」である．しかし，同一群落から採取した雄株と雌株であっても遺伝的多型が見られるので注意が必要である．現在までに Tak-1 株を Tak-2 株に 4 回戻し交配した植物体が得られている．なお，Y 染色体塩基配列の解読には Tak-1 株が用いられ，全ゲノム配列解読にはこの戻し交配株が用いられる．

### 4.3　培養法

ここでは培養細胞および植物体の培養方法について解説する．いずれの培養法も，光および温度条件は以下の通りである．

光量：連続光 50〜60 $\mu$mol photons $m^{-2}$ $s^{-1}$（約 20〜30 cm 離して並行に設置した 2 〜 3 本の 40 W 白色蛍光

**表 1**：ゼニゴケ *Marchantia polymorpha* L. 標準系統

| 系統名 | 略記 | 性 | 採取場所 | 文献 |
|---|---|---|---|---|
| Takaragaike-1[a] | Tak-1 | ♂ | 宝ヶ池周辺(京都市左京区) | 8) |
| Takaragaike-2[a] | Tak-2 | ♀ | | |
| Kitashirakawa-1 | Kit-1 | ♂ | 京都大学理学部附属植物園 | 友金ら（未発表） |
| Kitashirakawa-2 | Kit-2 | ♀ | | |

[a]かつては雄株雌株共に「E系統」と呼ばれていたが，常染色体に多型が存在するため，現在では別系統として扱っている．

灯から約 30〜40 cm 下の光量）

温度：22℃（30℃前後で生育が阻害される）

#### 4.3.1 培養細胞

ゼニゴケ培養細胞の維持には光照射が必須なので注意すること．

##### 4.3.1.1 液体培養

綿栓もしくはシリコ栓で栓をした三角フラスコに，その表示容量の 1/4 程度の 1M51C 液体培地（表 2）を加える(例：300 ml フラスコなら 70 ml 程度)．約 10 ml の培養細胞懸濁液を加え，130 rpm で培養する．1 週間毎に培養細胞懸濁液 10 ml 程度を新しい培地に加えて継代する．

##### 4.3.1.2 固体培養

1M51C 寒天培地（表 2）を用いる．約 1 ヶ月に 1 回継代する．

#### 4.3.2 植物体

ゼニゴケ植物体は開放的にも無菌的にも培養できるので，実験に適した培養法を選択する．

##### 4.3.2.1 無菌培養

植物体の無菌培養には 0M51C 寒天培地（表 2）を用いる．著者らは直径 9 cm，深さ 2 cm のプラスチックシャーレに厚さ 1 cm 弱の寒天培地を調製している．植物体を植えた後，シャーレの外周を通気性のある粘着テープ(例：3 M社製マイクロポア™ サージカルテープ)でシールする．継代は，まず新しい培地に滅菌水を数滴たらし（図 4 A），無性芽を杯状体ごと採取（図 4 B），新しい寒天培地に移し（図 4 C），滅菌水を数滴垂らして無性芽を培地表面に拡げる（図 4 D）．この際，先曲がりピンセットを利用するとよい．約 1 ヶ月で次世代の無性芽を回収できる．

無性芽の代わりに葉状体断片を新しい培地に移植してもよい．生長点を含む断片はその生長点が生長を続け，生長点を含まない断片は切断面から新しい葉状体を再生する．但し，無性芽を用いた場合の方がより良好に増殖する．

##### 4.3.2.2 開放培養

タッパーやカップなどの適当な容器にバーミキュライ

**表 2**：培地および各種ストック溶液の組成

0M51C/1M51C 培地（1 l 用）

| | |
|---|---|
| 10×0M51C ストック溶液 | 100 ml |
| 2% スクロース | 20 g |
| 0.03% L-グルタミン | 0.3 g |
| 0.1% カサミノ酸 | 1.0 g |

- 1M51C 培地の場合は 2,4-D ストック溶液 2 ml を加える
- 1N KOH で pH 5.5 に調整する
- 固体培地とする場合には寒天 14 g を加える
- 15〜20 分間オートクレーブ滅菌
- 室温または 4 ℃で保存

2,4-D ストック溶液（50 ml 用）

| | |
|---|---|
| 2,4-ジクロロフェノキシ酢酸 | 25 mg |

- 1N KOH 水溶液を適宜加えて溶解させた後にメスアップ
- −30℃で保存

10×0M51C ストック溶液（4 L 用）

| | |
|---|---|
| $KNO_3$ | 80 g |
| $NH_4NO_3$ | 16 g |
| $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ | 14.8 g |
| $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ | 12 g |
| $KH_2PO_4$ | 11 g |
| EDTA-NaFe (III) | 1.6 g |
| B 5-微量成分溶液 | 40 ml |
| B 5-ビタミン溶液 | 40 ml |
| 0.75% KI 溶液 | 4 ml |

- −30℃で保存
- 100 ml ずつチャック付ポリ袋に分注して保存すると便利

B 5-微量成分溶液（100 ml 用）

| | |
|---|---|
| $NaMoO_4 \cdot 2H_2O$ | 25 mg |
| $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ | 2.5 mg |
| $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ | 2.5 mg |
| $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ | 200 mg |
| $MnSO_4 \cdot 7H_2O$ | 1 g |
| $H_3BO_3$ | 300 mg |

- −30℃で保存

B 5-ビタミン溶液（100 ml 用）

| | |
|---|---|
| イノシトール | 10 g |
| ニコチン酸 | 100 mg |
| ピリドキシン塩酸塩 | 100 mg |
| チアミン塩酸塩 | 1 g |

- −30℃で保存

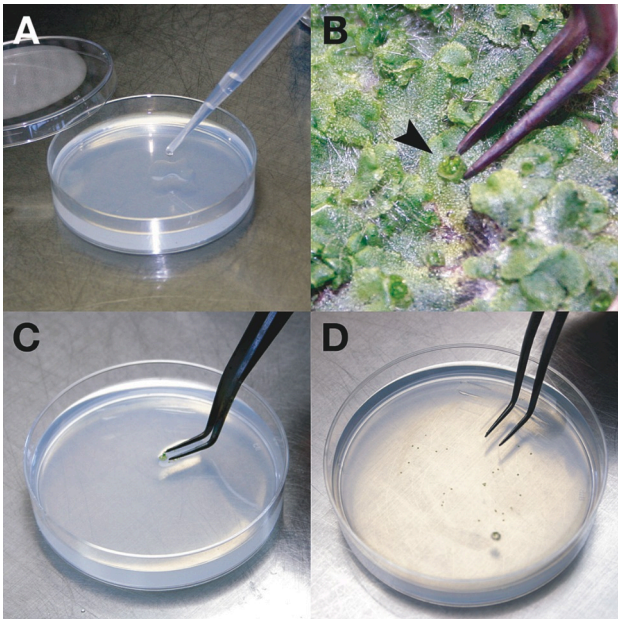



**図 4**：無性芽の無菌的継代
A，シャーレに滅菌水をたらす．B，杯状体ごと無性芽を採取する．C，シャーレに移す．D，ピンセットで拡げる．

トを 3〜4 cm 厚になるよう敷き，Hyponex® の 500〜1000 倍希釈溶液を注ぐ．この際，Hyponex® 希釈溶液の液面がバーミキュライトの表面を超えない程度にする．無性芽，葉状体あるいは胞子を植え，バーミキュライトが乾燥しないよう留意する．霧吹きなどで植物体に直接水分を供給すると良好な生育が期待できる．数週間に 1 度 Hyponex® の 500〜1000 倍希釈溶液を与える．
【注意】葉状体は乾燥に弱いので，培養装置・培養室などで風が直接当たらないようにする．逆に，密閉容器内で育てると湿度が過剰となり，形態異常，不稔，微生物の繁殖といった悪影響を及ぼすことがある．

## 4.4　交配法

### 4.4.1　生殖器誘導

上述の通り，ゼニゴケを生殖生長相に誘導して交配するには遠赤色光（730 nm 付近）が必要である．しかし，一般的な白色蛍光灯には遠赤色光が含まれていないため，以下に挙げる方法で遠赤色光を補う必要がある．正常な生殖器形成には遠赤色光が継続的に必要であり，途中で遠赤色光照射を中止すると生殖器形成が中断されて稔性を失うので注意する．

#### 4.4.1.1　LED

LED は単色光光源として優れ，消費電力が少なく寿命も長いので植物育成用の光源としての利用が広まっている．現在，遠赤色光 LED は複数のメーカーから入手可能で，著者らは三洋電機株式会社製の LED 光源システム（近赤外線 LED 基板：MIL-IF18（A），発光極大波長 734 nm，半値巾 13 nm　光源フレーム MIL-U200，光源コントローラ MIL-C1000T）を利用している．白色蛍光灯の間に LED パネルを設置し，その直下に植物体を置く．2 週間程度で生殖器の形成が始まるが，雄の場合精子を生じるまでにさらに 2 〜 3 週間を要する．遠赤色光 LED はゼニゴケの安定した生殖器誘導に極めて有効であるが，初期投資が大きいのが難点である．

#### 4.4.1.2　遠赤色蛍光灯

遠赤色光 LED の代わりに遠赤色蛍光灯を白色蛍光灯に加えて使用してもよい．この場合，40 W 白色蛍光灯 1 本に対し，20 W 遠赤色蛍光灯 2 本の割合で設置する．遠赤色蛍光灯は東芝（FL20S-FR-74）から入手可能である．遠赤色光を加えた植物育成用蛍光灯も市販されているが，期待される効果は得られていない．

#### 4.4.1.3　白熱電球

80〜100 W の白熱電球で連続照射する．植物体との距離は 40〜50 cm が適当であるが，多量に発生する熱線をカットするために熱カットフィルターが不可欠である．著者らは市販の角形シャーレ（例：Corning 社製 431110 番）に約 50 mM EDTA 水溶液を封入したものを白熱電球の直下に吊り下げて使用している．白熱電球は多量の熱を発生するため，十分な冷却能力を備えた培養環境で使用すること．

#### 4.4.1.4　自然光

自然光（太陽光）は可視光に加えて遠赤色光も含むので，長日条件で生殖生長相へ移行する．しかし，30°C程度の気温が継続する環境では生殖器の形成が抑制されるようである．日長が不足する季節であれば，遠赤色光を含む光源で補光する必要がある．

### 4.4.2　交配

ゼニゴケは運動能のある精子で受精する．この際水を必要とする点が，花粉を用いる被子植物とは大きく異なる点である．

#### 4.4.2.1　精子の採取

雄器托（目安として直径 5 mm 以上）にパスツールピペットで水をおき，数分間放置する（図 5 A）．精子が放出されると，水が白濁するのが肉眼で確認できる．見にくい場合には，雄器托上の水をパスツールピペットなど透明度の高い器具で吸い上げるとよい．位相差顕微鏡（400 倍程度）があれば精子の運動能を確認しておく．

#### 4.4.2.2　交配

採取した精子をパスツールピペットを用いて直径およ

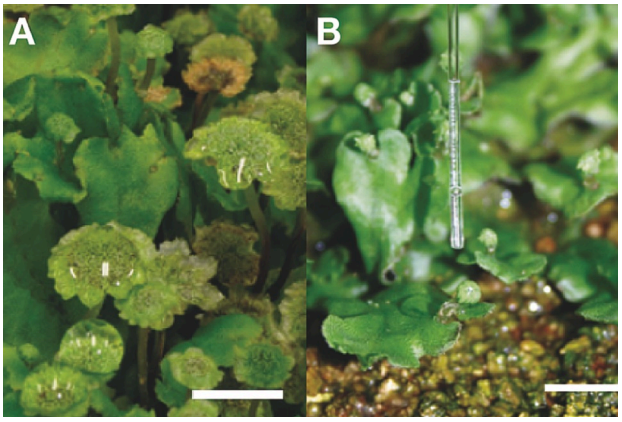



図 5：ゼニゴケの交配法
雄器托上に水をのせると精子が放出される（左）．精子を含む水（白濁している）をパスツールピペットで雌器托にかける（右）．白線は 1 cm を示す．

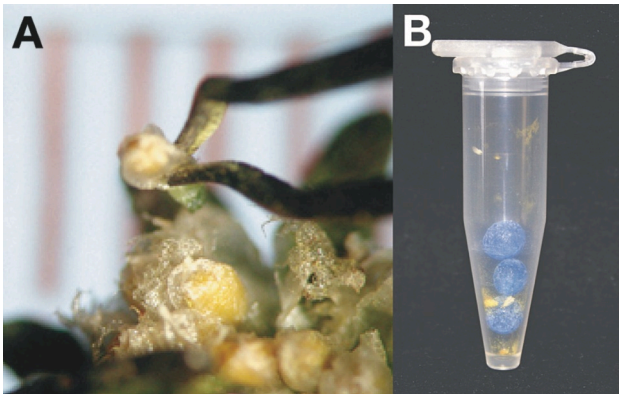



図 6：胞子の回収と保存
A，滅菌処理が必要な時は，胞子嚢を傷つけないよう根本の部分をつまんで採取する．背景の目盛りは 1 mm である．
B，胞子嚢（黄色）をシリカゲル（青色のビーズ）と共にサンプルチューブに入れる．

び柄の長さが 2〜3 mm 程度の雌器托にかける（図 5 B）．受精後約 1 ヶ月で胞子嚢が成熟し，胞子を回収することができる．

※注意：乾燥すると胞子嚢が裂けて胞子が飛散し，収率や滅菌効率が低下する．受精後 3 週間程度で，高湿度が保たれる環境（ラップによる保湿，より大きな透明密閉容器など）に移すと，胞子嚢の裂開が遅れて無傷の胞子嚢を採取しやすくなる．

## 4.5　系統保存方法

ゼニゴケ植物体の系統保存には胞子を用いるのが最も確実であるが，交配しなければならない点が短所である．確実性という点で改善の余地が残されているものの，葉状体および無性芽も長期保存が可能である．培養細胞については通常の継代以外の保存法は試されていない．

### 4.5.1　胞子

無菌培養が必要なければ，胞子嚢を自然乾燥させた後，シリカゲルとともに冷蔵または冷凍保存するだけでよい．以下に無菌培養を必要とする場合の操作を解説する．

**［試薬と機器］**

2 ×滅菌液（0.4% 次亜塩素酸ナトリウム（購入したものを 100%原液として），0.2% TritonX-100，滅菌水，先の細いピンセット 2 本，シャーレ，実体顕微鏡，照明器具，クリーンベンチ

**［実験方法］**

胞子嚢の滅菌

1．実体顕微鏡下，胞子嚢を傷つけないよう採取する．この時，胞子嚢の付け根をつまむようにすると破裂を防ぐことができる（図 6 A）．

2．胞子嚢を 500 μl の水が入った 1.5 ml サンプルチューブに入れる（水に浸けることで胞子嚢が破けるのを防ぐ）．

以下の作業はクリーンベンチ内で無菌的に実施する．

3．胞子嚢が入ったサンプルチューブに 2 ×滅菌液を 500 μl ずつ加えて穏やかに転倒混和後，1.5〜2 分間放置．

4．滅菌液をピペッティングで取り除き，滅菌水を 1 ml 加えて穏やかに転倒混和して洗浄する．

5．胞子嚢を潰さないようにゆっくりと液をピペッティングで取り除き，再び滅菌水を 1 ml 加えて穏やかに転倒混和して洗浄する．（この時，破れる胞子嚢もあるが，少なければ問題はない）

6．5．を繰り返す（計 3 回の洗浄を行うことになる）．

7．胞子嚢を潰さないようにゆっくりと液を除く．

8．乾熱滅菌した大粒のシリカゲルを 2 〜 3 個入れて，サンプルチューブのキャップを密閉する（図 6 B）．室温もしくは冷蔵庫で保存する．著者らの経験では最低半年は発芽率の低下は見られなかった．

### 4.5.2　葉状体

0M51C 寒天培地に生育しているものを暗所，4 ℃で保存することができる．この時，乾燥を防ぐためにシャーレのシールをパラフィルムに交換する．無性芽を新しい 0M51C 寒天培地に移植してすぐに冷蔵保存を開始したものの方が生存率がよく，5 年以上保存できた例もある．長期保存には微生物のコンタミネーションに特に注意が必要である．

### 4.5.3 無性芽

適切に乾燥処理された無性芽は長期保存に耐える．著者らの経験では，無性芽の乾燥は 0M51C 寒天培地上の葉状体を培地ごと自然乾燥させるだけでよく，例えば継代後の古い葉状体をこの目的に流用できる．乾燥が進むにつれ葉状体は枯死して変色するが，杯状体内の無性芽は濃緑色を保っている．これをサンプルチューブなどに回収して冷蔵または冷凍保存する．なお，杯状体からこぼれ出て水分を吸収した無性芽は乾燥保存に適していないようである．著者らは 4 ℃で 2 年間の保存に成功している．但し，生存率が著しく低下する場合があるため，重要な系統を保存する場合には補助的にのみ用いるべきである．無性芽の確実な保存法については，無性芽が乾燥耐性を獲得する機構とともに今後の研究に期待される．

＊遠赤色光を含む光環境やスクロースを除いた 0M51C 培地上では，杯状体の形成が抑制されるので注意すること．

## 参考文献


1）Y. L. Qiu, L. Li, B. Wang, Z. Chen, V. Knoop, M. Groth-Malonek, O. Dombrovska, J. Lee, L. Kent, J. Rest, G. F. Estabrook, T. A. Hendry, D. W. Taylor, C. M. Testa, M. Ambros, B. Crandall-Stotler, R. J. Duff, M. Stech, W. Frey, D. Quandt, & C. C. Davis, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **103** (2006) P.15511.

2）J. L. Bowman, S. K. Floyd, & K. Sakakibara, Cell **129** (2007) P.229.

3）S. Chiyoda, K. Ishizaki, H. Kataoka, K. T. Yamato, & T. Kohchi, Plant Cell Rep. **27** (2008) P.1467.

4）K. Ohyama, H. Fukuzawa, T. Kohchi, H. Shirai, T. Sano, S. Sano, K. Umesono, K. Shiki, M. Takeuchi, Z. Chang, S. Aota, H. Inokuchi, & H. Ozeki, Nature **322** (1986) P.572.

5）K. Oda, K. Yamato, E. Ohta, Y. Nakamura, M. Takemura, N. Nozato, K. Akashi, T. Kanegae, Y. Ogura, T. Kohchi, & Et Al., J. Mol. Biol. **223** (1992) P.1.

6）K. T. Yamato, K. Ishizaki, M. Fujisawa, S. Okada, S. Nakayama, M. Fujishita, H. Bando, K. Yodoya, K. Hayashi, T. Bando, A. Hasumi, T. Nishio, R. Sakata, M. Yamamoto, A. Yamaki, M. Kajikawa, T. Yamano, T. Nishide, S. H. Choi, Y. Shimizu-Ueda, T. Hanajiri, M. Sakaida, K. Kono, M. Takenaka, S. Yamaoka, C. Kuriyama, Y. Kohzu, H. Nishida, A. Brennicke, T. Shin-I, Y. Kohara, T. Kohchi, H. Fukuzawa, & K. Ohyama, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **104** (2007) P.6472.

7）K. Ishizaki, S. Chiyoda, K. T. Yamato, & T. Kohchi, Plant Cell Physiol. **49** (2008) P.1084.

8）S. Chiyoda, P. J. Linley, K. T. Yamato, H. Fukuzawa, A. Yokota, & T. Kohchi, Transgenic Res. **16** (2007) P.41.

9）K. Ono, Ohyama, K., & Gamborg, O. L., Plant Sci. Lett. **14** (1979) P.225.

10）S. Okada, M. Fujisawa, T. Sone, S. Nakayama, R. Nishiyama, M. Takenaka, S. Yamaoka, M. Sakaida, K. Kono, M. Takahama, K. T. Yamato, H. Fukuzawa, A. Brennicke, & K. Ohyama, Plant J. **24** (2000) P.421.

# 5．ヒメツリガネゴケ

青木　摂之[1)]，杉田　　護[2)]

ヒメツリガネゴケは高効率な遺伝子ターゲティングの適用が可能なので，逆遺伝学のモデル植物として活用されている．このコケの入手と培養法について簡単にまとめる．

## *Physcomitrella patens*

Setsuyuki Aoki, Mamoru Sugita

The moss *Physcomitrella patens* is an excellent model plant in the reverse genetics because high efficiency-gene targeting is applicable to this moss.　Here we describe briefly how to obtain, grow and maintain the wild type and transformed strains of this moss.

### 5.1　ヒメツリガネゴケの由来と入手先について

国内外の多くのラボで実験植物として用いられているヒメツリガネゴケ *Physcomitrella patens* の野生型株は，もともと Whitehouse 博士によりイギリスの Huntingdonshire, Gransden Wood で採取された株の子孫であり，1個の胞子に由来するものである[1)]．そのうちの1系統が Andrew Cuming 博士（Leeds 大学）から基礎生物学研究所の長谷部光泰教授に贈られ，それが国内各地の研究者に広まった．その後，ゲノム解析にあたり，David Cove 博士が維持していた同由来の株から1個の胞子由来の株が再単離され，Gransden2004 と名付けられ，The U. S. Department of Energy Joint Genome Institute（JGI）での配列解析に用いられた．基礎生物学研究所など JGI 以外の研究室で作出された EST などは Gransden2004 以外のラインを用いているので，SNPs を含んでいる可能性がある．また，フランス由来の Villersexel K3 ライン（エコタイプではない）が遺伝的地図作成に用いられている[2)]．Gransden2004 ラインは造卵器造精器誘導の同調率が従来の系統に比べて悪く，胞子体形成率が低い（長谷部光泰教授；私信による）．現在では，基礎生物学研究所，熊本大学，埼玉大学，東京大学，東京農業大学，名古屋大学，北海道大学など多くの機関のラボでヒメツリガネゴケを用いた研究が行われている．これから新たにヒメツリガネゴケを用いて研究を始めようという方は，該当する最寄りのラボに連絡してみるとよい．

1）名古屋大学大学院情報科学研究科
2）名古屋大学遺伝子実験施設

### 5.2　ヒメツリガネゴケの培養について

ヒメツリガネゴケの培養については，その他の実験方法とともに，長谷部教授のグループにより整備された綿密なプロトコルが WEB 上で公開されている[3)]．国内のおそらくほとんどのラボで，このプロトコルを各々のラボの諸事情に合わせて改変し，培養を行っていると思われる．ここではそのうちの一例として，青木研の例を簡単に紹介する．培地の名称などは長谷部研のプロトコルに準じた．

ヒメツリガネゴケの生活環は研究室の条件で2～3ヵ月で完結する．まず胞子が発芽し，先端成長と時折の分岐により平面的な原糸体（プロトネマ）組織が生じる．この原糸体に芽が生じ，葉と茎そして仮根を持つ立体的な茎葉体に分化する．次に茎葉体の先端に造精器と造卵器ができ，受精が起こり，胞子嚢を持つ胞子体が茎葉体の上に発達する．各発生段階が実験・観察に用いられるが，細胞を多く得るためには，再生・分裂能力の高い原糸体がよく用いられる[4,5)]．

コケ細胞は通常 25°C・連続明条件で培養する．照明の光強度は，白色蛍光灯（TOSHIBA，FL20SS・W/18 など）にアルミホイルを巻くなどして約 40 $\mu$mol m$^{-2}$ s$^{-1}$ に調整している．

#### 5.2.1　各種の培地

いったん安定な形質転換体を確立した後は，抗生物質なしで形質転換株を培養し続けても特に問題はない．ただし抗生物質入りの培地の上で培養すれば，耐性のない菌類や野生株の混入を防げるというメリットはある．培地は培養する細胞／組織の種類により異なり，原糸体は BCDAT 寒天培地あるいは BCDATG 寒天培地，茎葉体

は BCD 寒天培地，胞子は胞子発芽用寒天培地を用い培養する．それぞれの培地は主に濃縮したストック液を適量ずつ混ぜてつくる．ストック液は 4 ℃で保存する．表 1 にストック液の組成を示す．

[各培地の調整方法]

1．BCDAT 寒天培地：10 ml ずつのストック B，ストック C，ストック D，1 ml の Alternative TES，10 ml の Ammonium Tartrate ストック液（最終濃度：5 mM），20 ml の $CaCl_2$ ストック液（1 mM），8 g の寒天（0.8%[w/v]；SIGMA の A 9799 を用いている）に総量 1000 ml になるよう純水を加え，オートクレーブする（121℃，20 分間）．溶けた寒天培地をクリーンベンチ内でプラスチックシャーレに分注し，培地が固まったらシャーレの蓋を半分ほど開けて，クリーンベンチ内で送風しながら 20 分間ほど乾燥させる．室温で大きめのプラスチックのタッパ内で気密保存する．

2．BCDATG 寒天培地：BCDAT 培地と同じ量の各ストック液と寒天に 5 g のグルコース（最終濃度：5 g/l）を加える．これに総量 1000 ml になるよう純水を加える．この後は BCDAT 寒天培地と同様である．

3．BCD 寒天培地：10 ml ずつのストック B，ストック C，ストック D と，1 ml の Alternative TES，20 ml の $CaCl_2$ ストック液（1 mM）．8 g の寒天に総量 1000 ml になるよう純水を加え，オートクレーブする（121℃，20 分間）．この後は BCDAT 寒天培地と同様である．

4．胞子発芽用寒天培地：10 ml ずつのストック B，ストック C，ストック D と 1 ml の Alternative TES，10 ml の Ammonium Tartrate ストック液（最終濃度：5 mM），1.5 g の粉末 $CaCl_2$･$2H_2O$，8 g の寒天に総量 1000 ml になるよう純水を加え，オートクレーブする（121℃，20 分間）．この後は BCDAT 寒天培地と同様である．

### 5.2.2　原糸体・茎葉体の植え継ぎ

原糸体は再生・分裂能力に優れるため，これを植え継ぎコケ細胞を大量に増やすことができる．以下の操作はクリーンベンチ内で無菌的に行い，器具等はあらかじめオートクレーブ滅菌しておく．BCDAT 寒天培地あるいは BCDATG 寒天培地にシャーレのサイズに丸く切った透明セロハン（松屋，MO-430）をピンセットを用いて敷く．試験管に 20 ml ほど滅菌水を入れ，そこにシャーレ 2，3 枚分の原糸体をピンセットで集めて入れる．この原糸体をホモジナイザー（NS-310E，マイクロテック・ニチオン）で約 10 秒間破砕する．破砕用シャフトは NS-4 あるいは NS-7 を用い，シャフト回転速度は 4 ～ 5 に設定する．セロハンを敷いた 6 ～10 枚の寒天培地に，破砕した細胞を 3 ml ずつ駒込ピペットで分注して，シャーレの蓋を閉めた後に菌の混入を防ぐためにサージカルテープを巻き，インキュベーターに移して培養する．通常の維持培養や形質転換用に細胞を増やすための培養においては，シャーレを数枚積み重ねても問題はない．これを 4 日から 1 週間に一度行う．なおグルコースの入った BCDATG 培地の方がコケの生育は良いが，枯れるのも早い．原糸体を培養してしばらく経つと芽ができ，そこから茎葉体が生じる．適当な大きさに育ったらピン

**表 1**：ストック溶液の調製法

| ストック液 | 調製方法 |
|---|---|
| ストック B 液（×100） | 25 g の $MgSO_4$･$7H_2O$（最終濃度：0.1 mM）を総量 1000 ml になるよう純水に溶かす． |
| ストック C 液（×100） | 25 g の $KH_2PO_4$（最終濃度：1.84 mM）を KOH 水溶液（4 M）で pH 6.5 になるよう調整し，総量 1000 ml になるよう純水に溶かす． |
| ストック D 液（×100） | 101 g の $KNO_3$（最終濃度：1 M）と 1.25 g の $FeSO_4$･$7H_2O$（4.5 mM）を総量 1000 ml になるよう純水に溶かす．酸化して液が茶色く着色したら新しいものを調製して用いる． |
| Alternative TES ストック液（×1000） | 55 mg の $CuSO_4$･$5H_2O$（最終濃度：0.22 mM），614 mg の $H_3BO_3$（10 mM），55 mg の $CoCl_2$･$6H_2O$（0.23 mM），25 mg の $Na_2MoO_4$･$2H_2O$（0.1 mM），55 mg の $ZnSO_4$･$7H_2O$（0.19 mM），389 mg の $MnCl_2$･$4H_2O$（2 mM），28 mg の KI（0.17 mM）を総量 1000 ml になるよう純水に溶かす． |
| Ammonium Tartrate ストック液（×100） | 92.05 g の Ammonium Tartrate（最終濃度：500 mM）を総量 1000 ml になるよう純水に溶かす． |
| $CaCl_2$ ストック液（×50） | 7.35 g の $CaCl_2$･$2H_2O$（最終濃度：50 mM）を総量 1000 ml になるよう純水に溶かし，オートクレーブで滅菌する（121℃，20 分間）． |

セットでBCD寒天培地に移し，培養する．適量に増えたらピンセットで数本分ずつ採取し，新たなBCD寒天培地に植え継ぐ．

### 5.2.3　胞子の採取

上記の方法で原糸体を連続して10回以上植え継いでも生育などに問題は見られないが，長期にわたり栄養生殖を続けると突然変異が次第に蓄積する恐れがある．そこで時折胞子を発芽させ，「フレッシュ」な原糸体から新たに植え継ぎを開始させる．例えば形質転換には5，6回以上植え継いだものは使用しないようにする．

胞子を採取するためには，有性生殖を誘導し，胞子体を生じさせる必要がある．ヒメツリガネゴケの造精器と造卵器の発達は温度と日長に影響されることが知られる[6]．よく葉の茂った茎葉体を15℃，短日条件（8時間明16時間暗）で3週間ほど培養すると造精器と造卵器が茎葉体の先端に形成される．滅菌水を茎葉体全体が浸かるようシャーレに入れ，すぐに捨てる．これにより，精子がコケ組織の表面に残った水を介して造精器から造卵器まで泳ぎつき，受精が起こる．その後，約一カ月で直径2 mmほどの胞子嚢を持つ胞子体が生じる．茎葉体を水に浸す必要があるので，深型のシャーレが扱いやすい．またBCD寒天培地の代わりに，ジフィーセブン（ピートモスからなる園芸用の培養土ポット；サカタのタネ）を培地として用いると，多数の胞子体をより安定に得ることができるようである．この場合は，ジフィーセブンを適当な容器（例えばIWAKIのプラントボックス[41-012-002]）内に置き，水を適量加えてオートクレーブ滅菌し，茎葉体をジフィーセブン上に植えつけ培養を行う．こうしてできた胞子嚢をピンセットで採取し，数個ずつマイクロチューブに小分けして入れる．数時間マイクロチューブの蓋を開け放して乾燥させたのち，蓋を閉じ，4℃で保存する．少なくとも1年間は保存できることを確認している．

### 5.2.4　胞子蒔き

胞子嚢を保存していたマイクロチューブに900 $\mu$lの滅菌水と100 $\mu$lの次亜塩素酸を入れてよく混ぜ，5分間ほど放置する．この後，ピペットマンで上清を取り除き，1000 $\mu$lの滅菌水を入れよく混ぜて胞子嚢を洗浄し，胞子が沈殿した後に滅菌水を捨てる．この滅菌水による洗浄を3，4回繰り返す．最後に1000 $\mu$lの滅菌水を加え，ペッスル（Treff，ペレットミキサー）や滅菌した爪楊枝ですりつぶして胞子嚢を壊し，胞子が拡散した液をピペットマンで200 $\mu$lずつ胞子発芽用寒天培地に滴下する．寒天培地にピペットマンでさらに1000 $\mu$lの滅菌水を加え，培地上に胞子を広げた後，25℃，連続明条件で培養する．2～3週間で最初の植え継ぎができる量の原糸体が得られる．

### 5.2.5　株の保存

胞子（胞子嚢）の状態で長期保存できるので，株の保存は胞子の状態で行うのが良い．ただし原糸体の状態でも，寒天培地が乾燥しないようにシャーレをパラフィルムで二重に巻き，4℃，微弱光下で少なくとも数カ月は保存できる．時間が経ち，一見寒天培地とともに干からびてしまったように見えても，ペラペラになった寒天培地ごと新しい寒天培地の上に置くと，再び生育を開始する場合がある．

## 5.3　謝辞

株の由来などについて情報を頂いた長谷部光泰教授（基礎生物学研究所）に感謝します．

## 参考文献

1）N. W. Ashton, & D. J. Cove, Mol. Gen. Genet. **154** (1977) P.87.
2）Y. Kamisugi, M. von Stackelberg, D. Lang, M. Care, R. Reski, S. A. Rensing, & A. C. Cuming, Plant J. **56** (2008) P.855.
3）Y. Hiwatashi, T. Fujita, Y. Sato, T. Tanahashi, T. Nishiyama, K. Sakakibara, R. Kofuji, N. Aono, N. Sumikawa, T. Murata, & M. Hasebe, (2008) http://www.nibb.ac.jp/evodevo/PHYSCOmanual/00Eindex.htm
4）日渡祐二，西山智明，長谷部光泰，蘚苔類研究 7 (2000) P.276.
5）D. J. Cove, & C. D. Knight, Plant Cell **5** (1993) P. 1483.
6）A. Hohe, S. A. Rensing, M. Mildner, D. Lang, & R. Reski, Plant Biol. **4** (2002) P.595.

# 6．シロイヌナズナを用いた光合成研究

鹿内　利治[1)]

シロイヌナズナは個体のサイズが小さく，遺伝学では有利に働くこの特徴は，光合成の生理学，生化学においては問題になる場合がある．しかしながら，多くの突然変異株が単離，解析されていることや，ノックアウトラインなどリソースの充実は光合成研究においても魅力的である．植物の基本的な扱いはプロトコル集[1)]が手に入るので，ここでは特にノックアウトラインの入手法，解析法を解説したい．

## Photosynthesis research using Arabidopsis

Toshiharu Shikanai

Recent advance in plant science depended on the genetics using a model plant *Arabidopsis thaliana*. Although its small size is not ideal for physiology and biochemistry, the Arabidopsis genetics is providing many breakthroughs also in photosynthesis research. This protocol focuses on one of the powerful resources, the T-DNA knock out lines, and describes how to use them in photosynthesis research.

### 6.1　ノックアウトラインの検索のしかた

1．ノックアウトラインを解析したい遺伝子があれば，まずその遺伝子番号（例えば At2g05620）をメモし，Salk Institute Genomic Analysis Laboratory のサイトである SIGnAL を開く（http://signal.salk.edu/）．そこから，T-DNA Express のページを選ぶ．

2．Search の Query にメモした遺伝子番号を入力し検索する．

3．遺伝子の下にたくさんの矢印が出てくる．ノックアウトラインはいくつかの機関で独立に整備されており，その情報がまとまっている．やや複雑であるが，短い矢印で SALK，SAIL，GABI などのラベルがついているのがそれである．よくわからないものがあれば，クリックすると詳しい情報が得られる．目的の遺伝子について複数のノックアウトライン候補が得られることが望ましい（後述参考）．

4．良さそうな候補があればクリックする．まず〔seq〕を確認する．これは T-DNA のレフトボーダーから境界配列を読んだもので，T-DNA がどこにささっているのかを知ることができる．この情報は，大量の T-DNA ラインの挿入サイトを PCR によって決めたものに由来し，やや高い確率（2～3割？）で実際の挿入サイトではない配列を含んでいる（キメラな PCR 産物を読んでいると思われる）．この可能性を下げる為に，読まれている配列の長さが短いものは避けた方が無難である．

5．候補が決まれば〔order from ABRC〕をクリックする．ABRC（Arabidopsis Biological Resource Center）は，種子などを配布してくれるストックセンターである．実際に分与を依頼するには TAIR（The Arabidopsis Information Resource）user としての登録が必要である．Register 画面に進んで情報を入力する．登録はまず，研究室の PI に行ってもらう必要がある．種を送ってもらった場合，送料などを負担しなければならない．研究室の構成メンバーが独自に種を依頼した場合でも，登録の際 PI とリンクさせておけば，PI から一括して支払い可能である．種子送付の際，express mail を使うか選べるが，2008 年 11 月現在，フェデックスが日本への植物種子の送付を受け付けておらず，選ばない方が無難である．それでも ABRC の場合には，1か月ほどで種子が届く．ラインによっては ABRC ではなく NASC（The European Arabidopsis Stock Center）を経由したり GABI-Kat に直接依頼する場合もあるが，時間と手間がかかり，ABRC から手に入るラインがある場合は，それを優先させた方が良いであろう．

1）京都大学理学研究科

## 6.2　ホモラインの選抜方法

1．種子が届いたら，多くの場合それは，T-DNA をホモに持つものとヘテロに持つもの，さらには持たないものの混合である（ラインによってはホモ化されたものも入手可能．T-DNA がささっているのが確認済みなので重宝．）．そこで，T-DNA をホモに持つものを選ぶ必要がある．20 粒ぐらいの種子を播種する．T-DNA は多くの場合複数箇所に入っているので，薬剤耐性を T-DNA 挿入のマーカーに用いることは危険である．

2．T-DNA をホモに持つラインの選抜は PCR で行う．そのため植物から DNA を抽出する．我々は，子葉一枚から簡便に DNA を抽出する方法を用いているが，最近はキットや抽出装置が普及しており，ここでは詳細な解説を避ける．

3．ホモライン選抜のための PCR プライマーを設計する．SALK ラインの場合，T-DNA 挿入株の配列情報は T-DNA のレフトボーダーから読まれているので，レフトボーダー上の配列に設計されたプライマー（Pr-LB）と読まれているゲノム配列上に逆向きに設計したプライマー（Pr-F とする）では，T-DNA を含む植物で必ず産物が得られるはずである（図 1 A）．期待される PCR 産物は 300–500 塩基程度が望ましい．ここで産物が得られなければ，実際にここに T-DNA が挿入していない可能性がある．レフトボーダー上のプライマーの配列は SIGnAL のページから得られる（http://signal.salk.edu/tdna_FAQs.html）．ラインの出所が違えば使われているベクターが違うので，プライマーについては，それにあわせて確認する必要がある．一般に用いられているプライマーは必要以上に長く，我々の研究室では 21 塩基までプライマーを短くして用いている．

4．上述のプライマーセットで T-DNA 挿入染色体に由来する PCR 産物を増幅可能である．さらに T-DNA をホモに持つ植物とヘテロに持つ植物を区別する必要がある．その目的で，レフトボーダーから読まれた配列の上流に，シークエンス同じ向きにもう一つプライマー（Pr-R）を設計する（図 1 A）．先ほど設計した Pr-F と Pr-R の組み合わせで，T-DNA を含まない染色体 DNA から 300–500 塩基程度の産物が期待できる位置が望ましい．一般に T-DNA のサイズはこの PCR でのびないくらいに大きいので，T-DNA をホモに持つ植物では PCR 産物が得られない．このことは，DNA の抽出の問題などで PCR 産物が得られない場合と区別できないので，Pr-F と Pr-R の組み合わせの PCR では，同様に抽出した野生株 DNA を用いて安定に PCR 産物が得られることが条件になる．

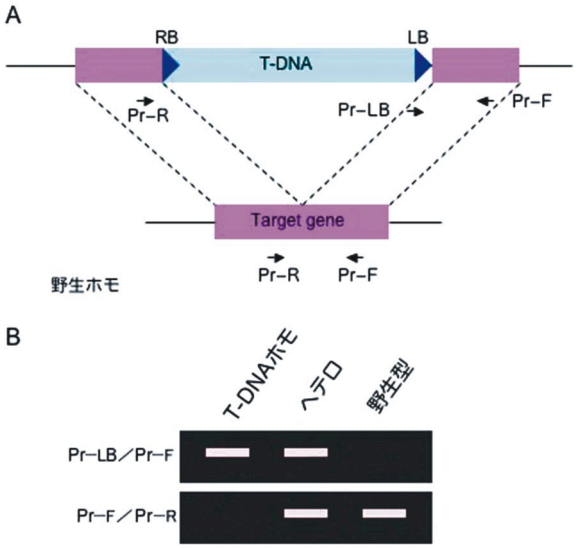



図 1：ホモライン選抜方法
A．Target gene が T-DNA の挿入により破壊されている．Pr-LB はレフトボーダー上に設定されたプライマー．Pr-F と Pr-R はこの位置に設計する．
B．PCR による遺伝子型の判定．

5．目的の T-DNA をホモに持つ植物は，プライマーPr-LB と Pr-F で PCR 産物が得られ，Pr-F と Pr-R の組み合わせで PCR 産物が得られないものである（図 1 B）．このような植物が得られない場合は，遺伝子のノックアウトが致死になる可能性がある．その場合は，T-DNA をヘテロに持つ個体を育てて採種し，次世代を解析する．

6．3．で得られた PCR 産物をシークエンスする．データベースと同じ配列が得られるはずで，レフトボーダー側の挿入位置が確認できる．T-DNA のライトボーダーに対応するプライマー（SIGnAL に情報がある．）とゲノムのプライマーPr-R を用いて PCR を行い，産物が得られればシークエンスを行う．ライトボーダー側の境界配列が得られる．しばしば複数の T-DNA がつながってゲノムに挿入し，T-DNA の構造によっては両側がレフトボーダーになる場合がある．ライトボーダーの境界配列が得られない場合には，Pr-LB とゲノムの Pr-R プライマーとの PCR も試みる．

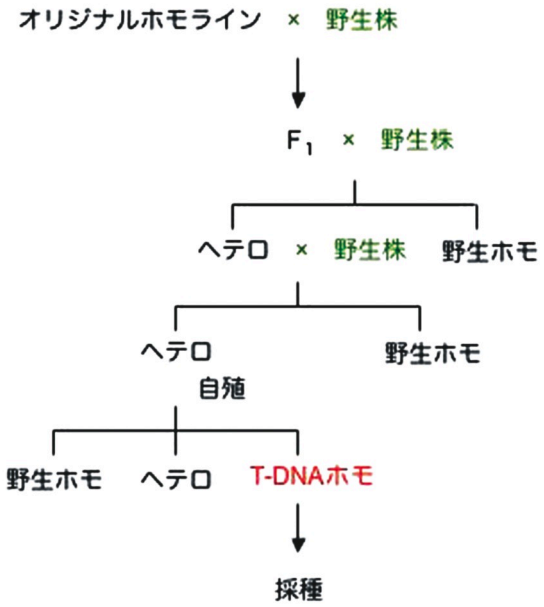


図 2：戻し交配作業の流れ

## 6.3 戻し交配と連鎖解析

目的のノックアウト株（T-DNA 挿入ホモライン）が得られれば，採種と同時に戻し交配を行う．クロロフィル蛍光解析のような非破壊の解析はこの植物を用いて予備的に行うことができる．しかしながら，この植物は，目的の遺伝子への T-DNA 挿入以外に多くの変異を含んでいる．目的遺伝子ノックアウト以外の異常が表現型を引き起こしている可能性が高く，これに気づかず結論を誤った例がいくつもある．また，他の研究室からノックアウトラインの分与を受けた場合，分与先にこの認識がなければ，問題を含むラインを解析することになる．充分な注意が必要である．

1．ノックアウト株が開花すれば，対応する野生株により戻し交配を行う．ノックアウト株の生育が著しく悪くない限り，ABRC から届いた種子を播種する際に同時に野生株も蒔いておく．本来戻し交配は，得られた $F_1$ 植物からその都度 $F_2$ を得るが，バッククロスを急ぐ際には，$F_1$ 植物にさらに野生株を交配する（図 2）．次世代では，T-DNA ヘテロと野生株に分離するので，PCR でヘテロ株を選抜し，その植物にさらにもう一度野生株を交配する．我々は三度の戻し交配を基本としており，次世代からヘテロ株を選抜し，$F_2$ 世代を得る．$F_2$ から PCR で T-DNA 挿入ホモ株を選抜し，大量に採種する．ここで（必要があればさらに早い世代で），T-DNA と表現型の連鎖を確認する．

2．3 回の戻し交配により目的遺伝子に連鎖していない異常の影響の多くを排除できる．しかし，目的遺伝子に強く連鎖した異常は残る．独立のノックアウトラインを持ち，同一の表現型が見られた場合，この問題が起きる確率は大きく下がる．この問題を排除するための最も直接的な方法は，ノックアウト株に野生型遺伝子を導入し，変異株の表現型が見られなくなることを確認することである．この場合は，形質転換にもとの T-DNA が持っている薬剤耐性マーカー以外を用いる必要がある．場合によって，この相補実験は不要である．例えば，EMS 処理で得られた変異株できっちりと遺伝学解析を行っていて，表現型がノックアウト株と同一であれば，必要は感じない．

**注意**

一連の作業は遺伝子組換え実験であり，機関による承認を受けていなければ行うことはできない．

## 参考文献

1）島本功，岡田清孝，田畑哲之「モデル植物の実験プロトコール」（改訂 3 版）秀潤社，（2005）

# 7．タバコ

山本　義治[1)]，小保方潤一[1,2)]

タバコは核・葉緑体の形質転換が可能であり，生化学実験にも適した研究材料である．本章ではタバコやタバコ近縁種の入手・栽培方法について紹介する．

## Tobacco

Yoshiharu Y Yamamoto, and Junichi Obokata

Tobacco can be used for nuclear and chloroplast transformation.　It is also suitable for biochemical studies.　In this chapter, we introduced methods for handling and growing tobacco plants.

### 7.1　はじめに

タバコ（*Nicotiana tabacum*）は核[1,2)]と葉緑体[3)]の両方を形質転換できる数少ない高等植物である．また，パーティクルガンを用いた一過的な遺伝子発現の効率が高く，よく利用される．さらに，ウイルスベクターも開発されており[4−6)]，遺伝子機能の大規模解析やタンパク質の大量発現を行うことが出来る．研究に用いられる品種としてはBright Yellow 4 (BY4), Samsun NN, Xanti等がある．名古屋大学遺伝子実験施設・杉浦グループによる葉緑体ゲノム配列決定[7)]にはBY4が用いられた．Petit Havana SR1は省スペース（矮性）なので形質転換によく用いられている．

*N. tabacum* のゲノムは異質複二倍体(2n＝24, SSTT)であり，*N. sylvestris*(2n＝12, SS)と *N. tomentosiformis*(2n＝12, TT)を祖先としている．*N. sylvestris* が母系の親であり，*N. tabacum* の葉緑体はこちらから来ている．ゲノム構成の単純さから *N. sylvestris* もよく研究に用いられる．ちなみに，*N. tomentosiformis* は短日植物，*N. sylvestris* は長日植物，*N. tabacum* は概ね短日である．*N. sylevestris* は *N. tabacum* と同じ条件で形質転換を行える．無傷葉緑体の単離を行うには *N. tabacum* が適している．*N. sylvestris* からは調製可能ではあるが困難であり，また *N. tomentosiformis* から調製するのは非常に困難であり，著者らは成功したことはない．

1）名古屋大学遺伝子実験施設
2）京都府立大学大学院生命環境科学研究科

### 7.2　培養細胞株

*N. tabacum* と *N. glutinosa* の細胞融合より得た光独立栄養株NTG-Pが確立されている[8,9)]．入手先はDr. Jack M. Widholm (College of Agricultural, Consumer, and Environmental Sciences, University of Illinois at Urbana-Champaign, 1201 W Gregory Ave, Urbana, IL 61801, USA, email: widholm@illinois.edu).

### 7.3　種子入手先

研究活動支援のためのタバコ種子ストックセンターのようなものは国内には見あたらないので，種子の入手に関しては研究者に直接コンタクトするのが一般的であると思われる．珍しい野性種などは下記のJTの研究所から入手可能である．また，海外の種苗会社等がインターネットで種子を販売している（Lehle　Seeds　http://www.arabidopsis.com/など）．

日本たばこ産業㈱　葉たばこ研究所
〒323-0808 栃木県小山市大字出井1900
tel：0285-23-3142（代表）

上記の研究所には，様々な品種，野生種のストックがある．譲渡して頂ける種子量の目安としては栽培種で0.1 g，野生種で0.01 g．譲渡条件に同意し申込書に記入の上譲渡依頼を行う．譲渡条件として「第三者への譲渡禁止」,「種子の増殖禁止」等の項目がある．申込書に記載されている譲渡条件が目的にそぐわない場合はJTと相談する．

タバコ種子の輸入は可能であり輸入時の検査は比較的簡便である．郵便封筒の外装に「tobacco seeds」と明記してあれば防疫所へ回され検査される．米国・欧州からの場合栽培検査は省略され，目視による検査（開封される）のみである場合が多いので，検査期間としては１－２日かかる程度である．一般的には輸出国と植物種の組合せで日本への輸入の可否や検査項目が決まる．詳細は植物防疫所の DB（http://www.pps.go.jp/eximlist/）を参照のこと．輸出国側の検査（国ごとに検査項目や栽培検査免除に必要な書類が異なる）もあるがここでは省略する．詳細は農林水産省植物防疫所（http://www.maff.go.jp/pps/）にて確認して頂きたい．

## 7.4　播種と幼植物の育成

乾燥種子は半日程度明るい所で脱イオン水に吸水させ発芽時期を揃える．種子を懸濁しパスツールピペットを用いてバーミキュライトに播種する．目安は 1000 cm² 当たり 20～30 mg（300 粒程度）．バットの底からバーミキュライトが水を吸い上げるようにする．播種後じょうろで上から水をやると種子がバーミキュライトの中に潜ってしまうので具合が悪い．ガラス板もしくはプラスチックラップを上蓋にし，芽生えが乾燥しないようにする．発芽後１週間程度で上蓋を外す．週に１－２度ハイポネックス（500～1000 倍希釈）を与える．大きく育てる場合はメトロミックスとバーミキュライト（土でもよい）の入った鉢に植え替える．タバコは水のやり過ぎには強いので神経質にならずに水やりをして大丈夫である．



**図１：**タバコ（*N. tabacum*, cv. BY4）
人の背丈くらいまで大きくなる．SR1 なら膝～腰丈程度で収まる．

[栽培メモ]

- 種子の大きさは鞘によって異なる．一つの花序のなかで最初の頃の花には大きな鞘が付き，中の種子も丸々としているが，徐々に鞘も種子も小さくなっていく．小さい鉢で育てるとこの差は顕著である．
- 葉緑体を単離するには肥料を与えすぎないように育てる方が澱粉が貯まらず収率がよい．また，収穫前に３日程暗処理し澱粉を消化させるやり方もある．
- 栽培温度は 25～30°C．
- 大麻とは異なりタバコの栽培自体は野外でも（もちろん温室でも）自由に行えるが，葉を乾燥して実用に供するのは違法とのこと（JT 葉たばこ研究所からの情報による）．
- 巻きたばこや葉巻などから栽培中の植物へウイルスが感染する場合があるので気をつける．喫煙者は石鹸で手を洗ってから温室に入ること．
- タバコの病害にはアブラムシやコナジラミなどがあり，オルトラン（住友化学）やブルースカイ（バイエル）等の農薬で対応出来る．虫取りシート（三共消毒商事株式会社）を温室にぶら下げておくと害虫が発生した際に発見しやすい．病害と防除法については栽培マニュアル[10] に詳しい記載がある．

## 7.5　種子の表面滅菌と培地への播種

１．50 ml の使い捨てチューブなどを用いて，乾燥種子を 70%エタノールに浸す．一分程度おいてエタノールを捨てる．
２．２%次亜塩素酸ナトリウム（５%溶液なら脱イオン水で 2.5 倍に希釈する）を注いで 15 分置く．時々撹拌する．（以下クリーンベンチでの作業）
３．滅菌水で５回以上すすぐ．
４．寒天培地（1/2 x MS，0.8%寒天，あるいは 1 x MS，３% sucrose，0.8%寒天など）に播種する．

[操作メモ]

- バーナーで焙ったハサミを用いて無菌的に鞘から取り出された種子は，表面滅菌処理を行わずにそのまま培地上に播種しても雑菌は生えない．
- 種子を「お茶パック」（トキワ工業）に入れてポリシーラーでシールすると扱いがラクになる．
- 枝の付け根のところに茎頂点があるので，そこを含むようにメスで切り取り，寒天培地（1 x MS，3% su-



図 2：無菌培養のタバコ
マジェンタ容器にて培養．

crose，0.8%寒天など．Magenta 容器（GA-7，Sigma）を用いると便利）に茎を挿しておけば，根や葉が発達してくる．

## 7.6　葉の表面滅菌

温室で育てた植物の葉を表面滅菌し組織培養することもある．パーティクルガンなどに用いる．

1．葉を切り取りビーカーなどに入れる．
2．70%エタノールを加え 1 分程度撹拌する．
3．エタノールを捨て，1%次亜塩素酸ナトリウムを加える
4．15 分間置く．時々撹拌する．
5．滅菌水で 5 回以上すすぐ．
6．寒天培地（1/2 x MS，0.8% Bactoagar あるいは 1 x MS，3% sucrose，0.8% Bactoagar など）に裏側を上にして置く．寒天はピンセットなどで少し崩しておくと組織との接触面積を増やすことが出来る．

## 参考文献


1）A. Caplan, L. Herrera-Estrella, D. Inze, E. Van Haute, M. Van Montagu, J. Schell, & P. Zambryski. Science **222** (1983) P.815.
2）G. An, B. D. Watson, & C. C. Chiang, Plant Physiol. **81** (1986) P.301.
3）Z. Svab, P. Hajdukiewicz, & P. Maliga, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **87** (1990) P.8526.
4）F. Ratcliff, A. M. Martin-Hernandez, & D. C. Baulcombe, Plant J. **25** (2001) P.237.
5）H. Hamamoto, Y. Sugiyama, N. Nakagawa, E. Hashida, Y. Matsunaga, S. Takemoto, Y. Watanabe, & Y. Okada, Biotechnology (N Y) **11** (1993) P.930.
6）J. A. Lindbo, Plant Physiol. **145** (2007) P.1232.
7）K. Shinozaki, M. Ohme, M. Tanaka, T. Wakasugi, N. Hayashida, T. Matsubayashi, N. Zaita, J. Chunwongse, J. Obokata, K. Yamaguchi-Shinozaki, C. Ohto, K. Torazawa, B. Y. Meng, M. Sugita, H. Deno, T. Kamogashira, K. Yamada, J. Kusuda, F. Takaiwa, A. Kato, N. Tohdoh, H. Shimada, & M. Sugiura, EMBO J. **5** (1986) P. 2043.
8）C. Xu, L. C. Blair, S. M. Rogers, Govindjee, & J. M. Widholm, Plant Physiol. **88** (1988) P.1297.
9）C. S. Goldstein, & J. M. Widholm, Plant Physiol. **94** (1990) P.1641.
10）大堀和信，黒田昭太郎 & 宇野良男，「タバコ栽培の新技術」，農文協，1978．

# 8．イネ

稲垣　言要[1)]

本章では，ポストゲノム時代に向けて整備されたイネの突然変異系統や遺伝解析用の種子系統について，その概要と入手法を中心に紹介する．後半は，筆者の研究室で行っているイネ栽培法を実例として示す．

## Bio-resources in Rice Research Area and Tips for Cultivation of Rice

Noritoshi Inagaki

In 2004, International Rice Genome Sequencing Consortium finished to determine whole rice genome sequence, which means the beginning of a new era for rice functional genomics.　In this issue, I'd like to introduce several bio-resources that will certainly contribute to the post genome era, namely core collections, introgression lines and mutant lines of rice.

### 8.1　はじめに

イネ属（*Oryza* 属）は 22 種（種として独立して記載すべきか議論のある種も含む）から構成され，その中で栽培種は，アジア原産で世界的に栽培されている *O. sativa* と西アフリカ原産でその地域でのみ栽培されている *O. glaberrima* の 2 種だけで，それ以外は野生イネにあたる[1)]．本章では，*O. sativa*，特にジャポニカ，水稲の話が中心となるが，可能な限り野生イネなど多様なイネのリソースについても紹介したいと思っている．

2004 年に国際コンソーシアムによってイネ（日本晴）の全ゲノム配列が決定され[2)]，これによりイネは，3 大穀物（イネ，コムギ，トウモロコシ）としての地位に加え，モデル植物としての地位を確立する地歩をつかんだと言える．この流れに呼応するように，ゲノム配列を活用するための解析ツールが次々と構築され，それを活用した成果が徐々に生み出されている．本章の前半では，これらの解析ツールの内，特に種子の形で配布されているリソースについてその概要と入手法について述べる．

### 8.2　種子の保管・分譲機関

研究用のイネ種子の保管と管理，分譲を業務として行っている日本の主要な公共機関としては，農業生物資源研究所に設置されている農業生物資源ジーンバンク（ジーンバンク　http://www.gene.affrc.go.jp/index_j.php）とイネゲノムリソースセンター（リソースセンター　http://www.rgrc.dna.affrc.go.jp/jp/），ナショナルバイオリソースプロジェクト（NBRP）のイネ部門をあげることが出来る．

農業生物資源研究所のジーンバンクは，植物・動物・微生物資源の探索収集を行い，特性を評価し，さらには増殖して配布までを行う組織として 1985 年に設立された．現在，イネ類に関しては 4 万 4 千件を越える遺伝資源を登録，保管しており，このような大量の種子を確実に管理するために，機械化された種子管理システムを導入している（図 1）．リソースセンターは，*Tos17* 突然変異系統，イネ遺伝解析材料（BILs，DHLs，CSSLs 系統，詳細については後述），イネ完全長 cDNA クローンの管理と配布を行っている．ともに農業研究を行う独立行政法人内に設置された拠点であることから，栽培イネをベースにしたコレクションが充実しており，農業研究に資するリソースが供給できる体制となっている．

一方 NBRP は，これまで国立遺伝学研究所や理化学研究所，あるいは各大学の研究室において個々に収集保存されていたバイオリソースをデータベース化し，各研究者に提供できる体制を確立することを目的に 2002 年から始まったプロジェクトで，その全体像については，ホームページ（http://www.nbrp.jp/）から見ることができる．イネ部門は，遺伝学研究所　系統生物研究センターを中核に運営されており，イネの統合データベース Oryzabase（http://www.shigen.nig.ac.jp/rice/oryzabase/top/top.jsp）が，系統検索や分譲依頼ページ

1）独立行政法人　農業生物資源研究所　植物科学研究領域　光環境応答研究ユニット

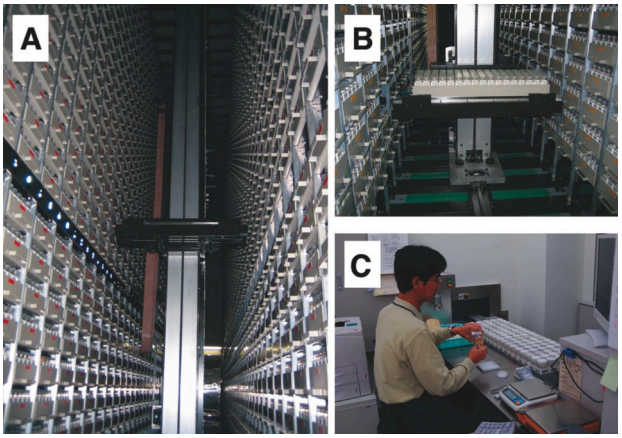



図1：農業生物資源ジーンバンクの種子管理システム．A：全自動リフトが設置された種子庫内の様子．庫内は氷点下1℃，湿度30%に保たれている．B：リフトが種子ケースを引き出しているところ．C：種子の出庫作業．全ての操作は管理端末から行える．ケースには5×17個の種子ボトルが収納されており，その全てがバーコードで管理されている．（写真提供：農業生物資源研究所　ジーンバンク　知花高志氏）

への入口となっている．参画している研究機関がこれまでに収集してきた遺伝資源がコレクションの核となっているので，保管機関ごとに特色のある多様な遺伝資源の供給が可能となっている．

## 8.3　イネ研究の解析ツールとして整備された種子系統

この節では，コアコレクションや遺伝解析用の種子系統，イネ突然変異系統など，新しい研究ツールとして注目されている研究材料について紹介し，その入手方法について述べる．

### 8.3.1　コアコレクション

イネと一言で言っても，その栽培（生息）地域は熱帯から温帯にまで拡がっており，耐乾性の強い陸稲もあれば，洪水になっても生き残る浮きイネもある．栽培イネを全滅させるような病原菌に対して抵抗性を示すイネも存在する．この驚異的とも言える能力は遺伝子に書き込まれているのだが，このような遺伝子の多くは，近代育種の過程で失われていったものが多いと推定され，現在栽培されている品種の中に見出すのは難しい．逆の言い方をすると，野生イネや在来栽培種（古い時代に栽培されていた品種）には，近代品種が失った農業形質を向上させる遺伝子が数多く埋もれていることを示している．さて，これを探索することを考えた場合，一体どの品種から解析を始めれば良いのか？　また，どの程度の品種数を解析した段階で結論を得ればよいのか？　など，一般の研究者では判断が難しい問題に直面する．そこで，バイオリソースの保管機関では，このようなニーズに応えるべく，全コレクションから多様性を失わないように注意しながら品種の絞り込みを行って「核となる品種のセット」を作り上げた．これがコアコレクションで，様々な機関で構築され，配布されているものもある[3]．

まずはNBRPイネ部門で作られている，野生イネのコアコレクションについて紹介する．このコレクションは，野生イネ18種と，ゲノム構成AA，BB，CC，BBCC，CCDD，EE，FF，GG，HHJJの9型の全てを含み，典型的で生息域が広い品種で構成するというコンセプトで作られた．このコレクションには，研究の目的やスケールに合わせて3つのランクが用意されている．ランク1は44の代表的アクセッションからなり，ランク2は64の代表的なアクセッションを含んでいる．加えて，さらに多くのアクセッションを調査する必要がある研究者のために，169のアクセッションからなるランク3も整えられた．これらの中から，自らの研究目的や規模に合わせて取り寄せを行えば良い．Oryzabase（http://www.shigen.nig.ac.jp/rice/oryzabase/top/top.jsp）から分譲依頼が行える．

一方，農業生物資源研究所は，栽培イネに特化したコアコレクションを構築している．このコレクションは，代表的な品種や系統のセットであればよいというコアコレクションの考えをさらに拡張し，DNAマーカーを用いた多型解析によって，客観的に多様性を評価しながら選抜したもので，その結果，ジーンバンクが保有するコレクション全体の遺伝的多様性と同じレベルの多様性を維持したコアコレクションが構築された[3]．現在，農業生物資源研究所からは，69品種で構成される世界のイネ品種[4]と50品種で構成される日本在来イネ品種[5]の2つのコアコレクションが配布されている．分譲依頼の手続きは農業生物資源研究所のジーンバンクのホームページで確認して欲しい．

### 8.3.2　遺伝解析用材料

イネを栽培化し，育種している過程は強い選択圧にさらされており，その結果，脱粒性が失われ，生産性が向上し，洗練された草型や食味を獲得することができた．その一方で，数多くの有用な遺伝子が失われていったことは前節でも述べた．これらの失われた重要遺伝子を座乗位置まで含めて再発見するために，野生種と栽培種，あるいは，古い栽培品種と新しい栽培品種，インディカとジャポニカを交配して得られたイントログレッション系統（introgression lines）と呼ばれる研究材料が最近注目されている．さらに，これらの系統は，ゲノム育種（テー

ラーメイド育種）の遺伝資源としても大きく期待されている[6–8]．

まずは，図2Aを用いて，この節で用いる専門用語の解説から試みたい．イネを交配すると，F1個体は両親から遺伝子を半分ずつ引き継ぐ．その自殖後代であるF2は，確率的には両親から50%ずつ遺伝情報を引き継ぐが，遺伝子座一つ一つを見てみると，花粉親由来の座もあれば，ヘテロの座，母親由来の座もある．そのF2種子について単粒系統法で自殖を繰り返させると，花粉親由来の染色体部分と母親由来の染色体部分がモザイク状になった系統群ができあがる．これをRILs（Recombinant Inbred Lines：組換え自殖固定系統群）と呼ぶ．一方，F1を戻し交雑すると，戻し交雑に使った親（反復親）に由来する遺伝子座が増える．こうしてできたBC1F1やBC2F1について単粒系統法で自殖させると，RILsに比べて反復親由来の染色体部分が多い系統ができあがる．これをBILs（Backcross Inbred Lines：戻し交雑自殖系統群）と呼ぶ．次にDHLs（Doubled-Haploid Lines：半数体倍加系統群）のメリットを紹介しよう．単粒系統法による自殖でRILsもBILsも大部分がホモの領域となっているが，それでもヘテロの領域を完全には除去しきれない．時に，その残ったヘテロ領域が解析に支障を与えることもある．DHLsは，F1個体の花から葯を取り出して培養するとともに染色体を倍加させて作りあげるので，初期の世代からヘテロ領域がないため，ヘテロに由来する問題が生じない．しかし，葯培養から再分化にかけて技術的に難しいステップがあるので，作られる事例は少ない．最後に，染色体断片置換系統群CSSLs（Chromosome Segment Substitution Lines）を説明する．この系統群は，遺伝子マーカーを用いてどの染色体部分が供与親（P2）のゲノム由来かをモニターしながら戻し交雑を続け，染色体の一領域だけが供与親（P2）由来で，残り全ての遺伝背景が反復親（P1）に戻ったものを集積し，それで全ゲノム領域をカバーするように組み合わせたものである（図2B）．その構築には膨大な時間とエネルギーが必要であるが，染色体の入れ替え構造が単純なために，遺伝子探査には非常に有効な研究資源となっている．実際，イネで作られたイントログレッション系統は，出穂期を決める遺伝子[10]や脱粒性遺伝子[11]の同定に大きく貢献した．さらに，コシヒカリ／Kasalath（反復親：コシヒカリ）のCSSLsからは，出穂期を調節したコシヒカリ系品種が迅速に育成されている[12]．このように，イントログレッション系統は，基礎研究から育種研究までの広い範囲で活用できる重要な素材となっている．

農業生物資源研究所のリソースセンター（http://www.rgrc.dna.affrc.go.jp/jp/）では，栽培品種間の交配で作られた置換系統群（表1）を分譲している．

また，NBRPイネ部門では，九州大学が中心となって，日印の栽培品種間でRILsを4系統，CSSLsを2系統構築している．加えて，オリザ属内の異種交配（*O. sativa*×*O. glumaepatula*，*O. sativa*×*O. glaberrima*，*O. sativa*×*O. meridionalis*）で構築されたCSSLsやRILsも作り上げており，分譲を受けられる．野生イネのコアコレクション同様，Oryzabaseから分譲依頼が行える．

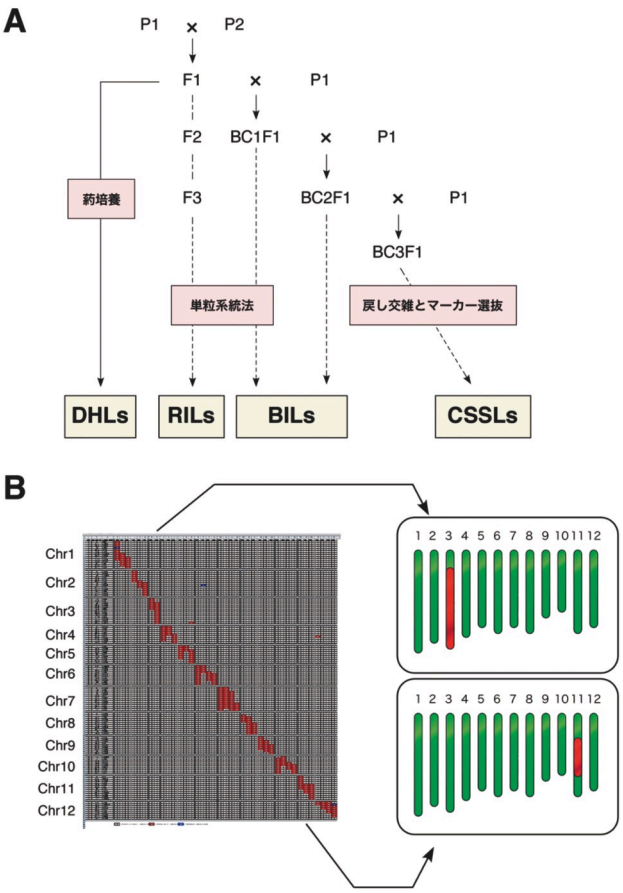



**図2**：イントログレッションラインの概念．論文[9]の図4を改変．A：DHLs（半数体倍加系統群），RILs（組換え自殖固定系統群），BILs（戻し交雑自殖系統群），CSSLs（染色体断片置換系統群）構築の概念を模式的に示す．B：CSSLs（染色体断片置換系統群）の概念を模式的に示す．左の図の縦軸は染色体が1番（Chr1）から12番（Chr12）までを模式的に表し，横軸はCSSLsの各系統を示す．DNAマーカーによる解析を行い，各系統の染色体の構成を調査し，各系統における染色体の由来をプロットした．白は反復親由来の領域を，赤は供与親由来の領域を示し，青はヘテロ領域を示す．右は，各CSSL系統の染色体構成のイメージ．緑色は反復親由来の領域，赤色は供与親由来の領域を示す．

**表 1**：農業生物資源研究所のリソースセンターから配布される置換系統群[7)]

| 交配組み合わせ | 集団 | 繰り返し親 | 系統数 |
|---|---|---|---|
| 日本晴／Kasalath | BILs | 日本晴 | 98 系統 |
| 日本晴／Kasalath | CSSLs | 日本晴 | 54 系統 |
| コシヒカリ／Kasalath | BILs | コシヒカリ | 182 系統 |
| コシヒカリ／Kasalath | CSSLs | コシヒカリ | 39 系統 |
| コシヒカリ／NonaBokra | CSSLs | コシヒカリ | 44 系統 |
| ササニシキ／ハバタキ | BILs | ササニシキ | 85 系統 |
| ササニシキ／ハバタキ | CSSLs | ササニシキ | 39 系統 |
| アキヒカリ／コシヒカリ | DHLs | | 212 系統 |
| 日本晴／コシヒカリ//コシヒカリ | BILs | コシヒカリ | 127 系統 |
| 日本晴／コシヒカリ//日本晴 | BILs | 日本晴 | 79 系統 |

### 8.3.3　イネ突然変異系統

#### 8.3.3.1　変異イネ

NBRP イネ部門には，分譲可能な突然変異系統が 8192 ライン登録されている．これらのラインは，アルキル化剤の一つ，メチルニトロソウレア（N-methyl-N-nitrosourea：MNU）を受精直後の花に処理することによって誘導された突然変異体で，水稲の品種「金南風」及び「台中 65 号」を用いて作られた[13)]．これらは，九州大学遺伝子資源開発研究センターにおいて作出されたもので，各系統の形質は調査されており，表現型から検索して絞り込むことが出来る．アルキル化剤による変異誘発のため，変異の中心は 1 塩基置換で[13)]，loss-of-function だけでなく gain-of-function 変異が得られることも期待される．近年，1 塩基多型を検出できる TILLING（Targeting Induced Local Lesion IN Genomes）法[14)] が開発されているので，これを活用することによって，map-based cloning などの遺伝学的解析を踏まずに変異遺伝子を同定できる可能性も出てきた．分譲依頼は，http://www.shigen.nig.ac.jp/rice/oryzabase/nbrpStrains/kyushuGrc.jsp からオンラインで行える．分譲依頼後，九州大学と申請者が所属する機関とで MTA（Material Transfer Agreement　分譲同意書）を交わすことになり，その後，種子を受領することになる．

#### 8.3.3.2　ノックアウトライン

数多くの研究者が，T-DNA や *Ac*/*Ds* などのトランスポゾンやレトロトランスポゾン *Tos17* をゲノム上に転移させることで挿入変異を導入した系統群を整え，それらは分譲されており，有効な研究資源となっている．特に，個々の系統におけるトランスポゾンなどの挿入位置は inverse PCR 法や tail PCR 法などによって決められ，それが挿入部位の隣接配列（FST＝flanking sequence tag）としてデータベース登録されるようになった．その配列情報は，既に Rice Annotation Project Database: RAP-DB（http://rapdb.dna.affrc.go.jp/）や Rice Functional Genomics Express Database: RiceGE（http://signal.salk.edu/cgi-bin/RiceGE）などの統合データベースにおいて，ゲノム配列に対応付けられており，ゲノム上のどこにタグの挿入されたラインが存在するかを簡単に検索できるようになっている．まずは，これらのデータベースを入り口として，研究対象の遺伝子が破壊されたラインの有無を調査すると良い．

ここでは，イネ本来が持つレトロトランスポゾン *Tos17* による挿入変異系統である農業生物資源研究所のミュータントパネルを紹介する．この系統群はイネ内在性の転移因子を活用しているために遺伝子組換えに関する制約を一切受けないメリットがある．遺伝子組換え生物の取り扱い設備が限られている研究機関にとっては有効な研究資源になるだろう．後半には，韓国の POSTECH（Pohang University of Science and Technology）から分譲されている T-DNA の挿入変異系統の取り寄せについて述べる．

##### 8.3.3.2.1　レトロトランスポゾン *Tos 17* ミュータントパネル

イネの内在性レトロトランスポゾン *Tos17* の転移を培養によって活性化させ[15)]，ゲノムあたり平均 8 コピーまで増幅させた後に再分化して作成された「日本晴」遺伝子破壊系統を総称してミュータントパネルと呼ぶ．これまでにおよそ 5 万系統の変異株が作出され，これによってイネ遺伝子の 50％が破壊された変異系統のプールができたと推定さている．*Tos17* 挿入隣接配列は，24000 件読まれてデータベース化されているので，目的遺伝子近傍への *Tos17* の挿入の有無が即座に解析できるようになった[16)]．また，例え目的遺伝子近傍に *Tos17* 挿入配列が見いだされなくとも，変異株から単離した DNA を三次元的に混合したスクリーニング用 DNA の分与を受け，それを鋳型として目的遺伝子 primer と

*Tos17* primer の組み合わせで PCR 増幅すれば挿入変異株が見つかる可能性も残されている．変異系統の検索，各系統の表現型確認，種子分譲依頼が，*Tos17* ミュータントパネルデータベース（http://tos.nias.affrc.go.jp/~miyao/pub/tos17/）から可能となっている．なお，各ラインの種子がどの研究者に分譲されたかについてはホームページ上で公開されるシステムになっている．

リソースセンターから送られてくる種子は 20 粒程度なので，世代促進して採種する必要がある．これらの種子は再分化当代なので，変異がホモ，ヘテロ，なしのものが 1：2：1 の比で分離する．それぞれの個体の一部から DNA を抽出し，サザン解析等で目的の変異がホモかヘテロかを確認しながら世代促進する．致死性や不稔を与える変異の場合，変異をヘテロの状態で維持しなければならないので，ヘテロラインも処分せずに温存しておくことをお薦めする．

このラインを用いる上での注意点は，目的の遺伝子に *Tos17* が挿入されている以外にも複数カ所に *Tos17* が挿入されていることを認識しておくことであり，その影響を注意深く除去しなければならない．このためには，別の挿入変異株を探して共通の表現型を示すことを確認するか，戻し交雑して *Tos17* 挿入部位を目的遺伝子のものに減らしてから確認するなどの努力が必要である．

#### 8.3.3.2.2　T-DNA タギングライン

韓国の POSTECH（浦項工科大学，Pohang University of Science and Technology）の Gynheung An 教授は，ジャポニカ品種，Dongjin と Hwayoung を用いて T-DNA の挿入ライブラリーを作り上げた[17–20]．T-DNA の挿入部位の隣接塩基配列が網羅的に読まれており，FST としてデータベース登録されている．このライブラリー作成に用いられたベクターは 4 種類で，その特徴を表 2 に示す．エンハンサー配列を持つベクター（pGA2715 and pGA2772）で作出されたライン[17,20]では，T-DNA の挿入によって遺伝子破壊が引き起こされるだけでなく，T-DNA 挿入部位近傍の遺伝子に activation tagging の効果が現れる可能性もあるので注意が必要である．

これらの系統は遺伝子組換えイネであることから，受け入れを考えるならば，まずは遺伝子組換え実験計画書を作成し，所属機関から実験の許可を得るなど周到な準備が必要である．また，これらの種子の輸入は，遺伝子組換え生物の搬入に当たるので，そのための手続きも完了させなければならない．

遺伝子組換え実験が許可されたならば，具体的な入手手続きに進む．手順は，POSTECH RISD（Rice T-DANN Insertion Sequence Database, http://www.postech.ac.kr/life/pfg/risd/index.html）に記載されている．具体的には，POSTECH に分与依頼の電子メール（sookan@postech.ac.kr）を出し，MTA フォームをホームページからダウンロードして 2 部作成し，両方を An 教授に送付する．この 2 部のうち 1 部については，An 教授がサインしたものが，種子と一緒に返送されてくるので請求者側の資料として保管しておく．

MTA フォームの送付先：
Gynheung An
Department of Life Science
Pohang University of Science and Technology
Pohang, 790–784, Republic of Korea.

通常は，検疫手続きが完了したイネが国際郵便で届く．（郵便開封前に検疫手続きがなされているかを確認しよう．検疫手続きがなされていない場合，絶対に開封せずに，所属機関の遺伝子組換え実験安全担当者に連絡して指示を受ける．その後，最寄りの植物防疫所に持参して，検疫手続きを完了させることになる．各自の研究機関と植物防疫所の間の往復も，遺伝子組換え生物の搬出と搬入に当たることに注意してほしい．これを防ぐためにも，種子を送る封筒には「Rice Seeds」など，植物種子が在中されていることを明記してもらうようにリクエストしておこう．）

送られてきた種子は 20 粒程度であり，実験に入る前に一世代増殖ステップを取り，実験によってはホモラインを確立する必要がある．なお，Dongjin と Hwayoung は，日本でも問題なく育ち採種できている．

2007 年 4 月に分譲を受けた時のやり取りでは，POSTECH RISD で管理されているイネ種子のうち 20%程度に，データベース登録された位置に T-DNA が挿入されていない系統が混在していることが書かれていた．このため，世代促進中にイネ個体より DNA を単離し，T-DNA がデータベース通りに挿入されているかを検証しておく必要もある．なお，POSTECH においても再配列解析が進められているので，このような T-DNA の非挿入ラインの数は，今後減っていくと思われる．

**表 2**：POSTECH の T-DNA 挿入系統に使われているベクター[17–20]

| VECTOR | 用途・特徴 |
|---|---|
| pGA2707 | promoter trapping |
| pGA2715 | activation tagging/ promoter trapping |
| pGA2717 | bidirectional gene trapping |
| pGA2772 | activation tagging vector |

#### 8.3.3.2.3　それ以外のタギングライン

POSTECH 以外にも数多くの研究機関がタギングラインを作成している．今回は，それらのホームページを紹介するにとどめる．

Oryza Tag Line（T-DNA, http://urgi.versailles.inra.fr/OryzaTagLine/）

Rice Mutant Database（T-DNA, http://rmd.ncpgr.cn/）

Shanghai T-DNA Insertion Population（T-DNA, http://ship.plantsignal.cn/index.do）

Zhejiang University（T-DNA, http://www.genomics.zju.edu.cn/ricetdna.html）

University of California Davis, Sundaresan Lab.（*En*/*Spm*, *Ac-Ds*, http://www-plb.ucdavis.edu/Labs/sundar/Rice_Genomics.htm）

Taiwan Rice Insertional Mutants Database（T-DNA, http://trim.sinica.edu.tw/）

CSIRO Plant Industry Internet（T-DNA, http://pi.csiro.au/fgrttpub/）

これらに加えて，FOX Hunting System（Full-length cDNA Over-eXpression gene hunting system イネ完全長 cDNA を網羅的にイネ内で過剰発現させるシステム）などのプロジェクトも進行中で，これらの遺伝子組換えイネ系統も共同研究をベースにすれば分譲を受けられる．また，近い将来には，このような開発中リソースも公開される時代が来ると予想され，ますますイネリソースが充実してくることが期待される．

#### 8.3.3.2.4　その他の国からの輸入

植物防疫所のホームページ（http://www.maff.go.jp/pps/index.html）によると，イネ属（*Oryza* 属）種子の輸入は制限が多いことがわかる．籾殻が付いた状態で輸入できるのは，韓国，北朝鮮，台湾からだけである．

それ以外の国からの輸入は不可能なのだろうか．ホームページなどによると，以下の条件を満たすならば，上記 3 地域以外からでも輸入する道が残されていることが示されていた．①輸出国政府機関が発行した植物検疫証明書を取っていること，②その国から輸入しなければならない理由があること，③籾殻やわらの部分（輸入禁止品），土が完全に除去された玄米であること，④健全な外見で，病気の痕跡や昆虫などの混入が見られないことである．この条件を満たした種子を国際郵便（小包郵便物，小形包装物）で送付してもらう．その際，外装には「植物在中」と明記してもらうことと，輸出国で所得した植物検疫証明書を外に貼付してもらうことが重要だ．これにより輸入時には植物検疫が行われ，この検査に合格すれば輸入が認められる．このように条件は厳しいものの，しっかりと条件を満たせば輸入できるので，どうしても取り寄せることが必要な場合は，最寄りの植物防疫所にご相談のうえ，挑戦してみてはいかがだろうか．

### 8.3.4　イネ種子の入手法のまとめ

ここで紹介したリソースは，長い年月をかけて世界中から収集されてきた品種群であったり，膨大な時間と労力を払って構築されてきた系統群である．分譲を受けた後は，取り交わした MTA や規則を遵守することはもちろんであるが，敬意を持って研究ツールとして有効活用したい．分譲システムの活用によって大きな成果が生み出されれば，リソースコミュニティーの健全な発達にも資するので，分譲を受けるだけでなく，その恩返しとして，上手に使って大きな成果を上げていただければと思う．

これら以外にも，イネの特殊な系統を保有する研究室は数多く，共同研究をベースにすれば，それらのリソースの分譲を受けることも可能になるだろう．これらについては，個別に問い合わせをしていただきたい．

## 8.4　イネ栽培法

### 8.4.1　概論

研究機関・研究者ごとにイネの栽培方法には流儀があり，各研究者が自らの研究目的や研究環境に合わせて，いろいろと工夫しながら栽培を行っているのが実情である．ここではまず，筆者の研究室で日本晴や農林 8 号に適用している栽培法を紹介する．これ以外にも栽培法を記したプロトコールブック[21]もあるし，いろいろなホームページに栽培のヒントは埋め込まれている．これらの資料も参考に取り組んでいただければと思う．あと，健全なイネを育成するためには，栽培の実務や原理を知っていたほうが良い．このための参考書として，農業高校向けの栽培の教科書[22]が向いているので，こちらも一読しておくことをお勧めする．野生イネは，栽培イネに比べて，その栽培には数多くの注意点がある．野生イネに挑戦する方は，遺伝学研究所の野生イネ栽培プロトコール（http://www.shigen.nig.ac.jp/rice/oryzabase/nbrpStrains/nigProtocol.jsp）も参考にしていただきたい．

イネは亜熱帯原産の作物であり，育種によって生み出された新品種を活用することで栽培地域が段階的に北上し，現在は，その北限が北海道の北東端にまで達している[23]．しかしながらこのことは，地域ごとに栽培に適した品種が異なることも意味している．全ゲノム配列が決定

された日本晴は，北海道の屋外で採種まで栽培することは困難で，ガラス温室やグロースチャンバーなどの設備が必要となるだろう．研究場所や研究環境によっては，品種選定にも注意が必要である．

グロースチャンバーで栽培する際には，栄養生長を促進するために長日条件を与えることが多いが，限界日長（これ以上明期が長くなると，もはや出穂しなくなる明期の長さ）には注意したい．日本晴の場合，限界日長は15時間付近と思われ[24]，たとえば16時間明期を与え続けると出穂しなくなるので，採種を考える場合には明期の長さについても考慮が必要である．筆者は，14時間30分の明期（28℃）と9時間30分暗期（23℃）のサイクルを与えることが多く，この場合，日本晴で播種後90日目周辺に出穂する．一方，開花促進は，短日処理するのが最も容易で効果的である．8～10時間明期の処理を2週間与えれば，そのおよそ1ヶ月後には出穂がもたらされる．

### 8.4.2　育苗

[準備]

① 枠付きの育苗箱（図3　プラグトレー，ピットトレーなどで代用可能）
② 育苗土（住友化学　合成粒状培土ボンソル2号など）
③ イネ種子
④ 次亜塩素酸溶液

[休眠打破]

1年以上乾燥状態で保存されていたイネ種子の休眠は打破されている．しかし，採種直後の新鮮な種子や野生イネの種子の場合は休眠が深く，打破する処理が必要となる．この場合，種子を40℃で数日間，通風乾燥すればよい．野生イネの場合は，低めの温度（35℃以下）で通風乾燥しないと発芽率が低下すると指摘している文献[21]もある．

[種子の選抜]

種子は，比重が大きく充実しているものほど発芽率が良く，その後の生育も良好である．生化学実験に用いる材料などを均一に育成したい時などは，塩水選と呼ばれる比重を基準にした選抜法で登熟不良の種子をあらかじめ除去しておくと良い．具体的には，水0.9 lに塩化ナトリウム（食塩）240 gを溶かして比重1.13 g/mlの塩水を作り，この溶液に沈む種子だけを用いる．

[発芽処理]

2倍希釈した次亜塩素酸溶液に15分間浸し，弱く振盪しながら滅菌する．籾殻などには病原菌や害虫が混在していることが多いため，この滅菌処理は確実に行いたい．種を水道水で洗ってから水中に沈め，28℃に設定したインキュベーター内で2日間吸水させる．この水は毎日取り替えた方が良い．48時間後には，種子は鳩胸状態を示すようになる．

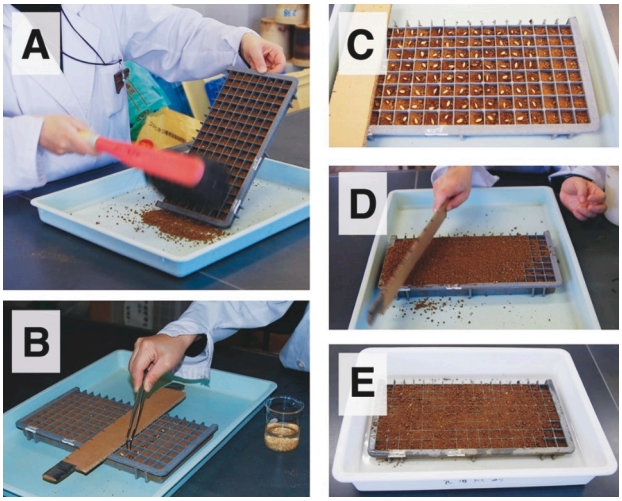


図3：枠付き育苗箱への播種　A：育苗箱に8割がた土を詰める方法．その後に播種し（B，C）覆土して（D）完成（E）．

[播種と栽培]

私たちの研究室では，数多くの系統を一つの育苗箱に植えられるように，枠付きの育苗箱を使っている（図3）．プラグトレー，ピットトレーという名で売られている農業資材の中には代用できるものがある．育苗箱に8割程度となるよう育苗土を詰めたものを用意する．育苗箱に8割がた育苗土を詰めるには，箱を傾けてブラシをかけると良い（図3A）．種子を1枠に1個ずつ投入し，作業後に覆土する．育苗箱をバットに置き，箱が半分程度沈むくらいまで水を満たす（図3E）．発芽してくるまでは，育苗箱を完全に水没させないように注意したい．28℃に保ったグロースチャンバー，あるいは温室にて，2～3週間程度栽培する．茨城県つくば市において屋外でイネ栽培をさせる場合，この育苗作業は，遅くとも5月中旬までにスタートさせないと採種するのが厳しくなる．

### 8.4.3　プール栽培

ここでは，水田圃場を持たない研究者にも比較的容易にイネを栽培して採種することができる，屋外でのプール栽培法を紹介する．

[準備]

① 木枠（図4A　幅21 cm厚さ2.5 cmのラワン材をカットして枠としたもの．筆者の研究室では，125

cm×230 cm の木枠を使っていて，これに 50 個（5 ×10 個）のポットを沈めて 50 個体のイネを育てる．この時の株間は 25 cm 程度である．これ以上ポットの個数を増やすと，株間が近くなりすぎて分げつ（枝分かれ）の発生が抑えられるなど生育にはマイナスの効果が出る（図 4 E）．なお，このサイズのプールに水を満たすとおよそ 600 l で，その重量は 600 kg となるので，設置場所には注意する．また，枠の 4 隅はしっかりと固定しておかないと，水の重さで壊れることがある．）

② ビニールシート（厚さ 0.4 mm くらいのビニールシート．サイズは木枠の大きさによる．木枠にかぶせて，ビニールの端を木枠の下にしっかりと押し込むこと．図 4 B）

③ ポット（1/5000 アール　ワグネルポット，あるいは，ポリエチレン製でバケツ型の 3.5 l ポリポット）

④ 育苗土（住友化学　合成粒状培土ボンソル 2 号など）

[移植と栽培]

前節の育苗法で 2 ～ 3 週間育てたイネを移植する．移植は，どうしても根を傷つけてしまうので，根が張り，吸水能力が回復するまでのイネは弱々しく，栽培には注意が必要である．通常の栽培イネでは，根が伸びて活着するためには日平均気温が 12℃を越えている必要がある．そこで，屋外で栽培する場合，移植は日平均気温が 12℃を越えてから行うこと．茨城県つくば市で栽培する場合は，4 月中旬頃から移植が可能となる．また移植直後は，根の傷みからイネの吸水能力が低下しているので，数日間，プールの水位を高めにした方が良い．イネは活着すると葉や分げつを規則的に増やし，旺盛に育つ．

イネは生育ステージによって水の必要量が大きく異なる．イネの品種が一定で，生育が揃っていれば，栄養生長後期にはプールの水位を下げ，いわゆる中干しを行っても良い[22]．これにより土壌に酸素が供給され，土壌中の硫化水素や有機酸などの有害物質の含量が低下し，根が健全に保たれる．ただし，生殖生長期に入ると必要水量が増すので，その時期までにはプールの水位を上げ，渇水させないような注意が必要だ．生育ステージの揃っていないイネや，出穂期の異なるイネを同一プールで栽培する場合は，常時満水で栽培した方が問題は少ない．屋外で栽培すると，どうしても雑草が生えて来るので，大きくならない内に引き抜いて処分しよう．

[施肥]

ボンソル 2 号など，肥料を含んでいる育苗土を用いた場合，移植直後は含有された肥料を使って育つ．移植後 30 日程度経過すると葉色が薄くなってくる．これは肥料不足の兆候なので，追肥を行う．私たちの研究室では，「888」とラベルされた粒状の化成肥料（肥料重量の 8 % が窒素，8 %がリン，8 %がカリウムであるように調製されている）をポット 1 個あたり 6 ml 与えている（ファルコンチューブを下から 6 ml のところでカットし，そのチューブですり切り 1 杯で 6 ml としており，5 g に相当する）．過剰な施肥は，病害虫の蔓延の原因となるので，葉色をよく確認してから施肥するかを決めている．葉色が濃緑色を保っている場合は追肥せず，しばらく様子を見た方が良い．移植 70～80 日目あたりに再度，同様の追肥を行う．

[病気と害虫，防鳥など]

種子膨潤時に次亜塩素酸により滅菌処理を確実に行い，また，育苗土も市販の滅菌された物を使えば，初期生育における病害虫の発生は確実に防ぐことが出来る．しかしながら，長い栽培期間には病気や害虫が発生することもある．これを初期に発見し，確実に防除するためには専門的な知識が必要なので，近隣の農業研究者や農業従事者の方に支援を依頼できる体制があると心強い．あと，出穂するまでには防鳥網を張るなど，スズメの食害に対する対応が必要である．

[採種と保管]

一般的な栽培品種を 6 月に移植すると，8 月には出穂が始まる．収穫は，出穂後 40 日から 50 日の間に行うのが良い．その頃には籾の色は黄色になり，種子は固く締まっている．それ以前では，未登熟で緑色の種子（青米）が多く，遅くなると，胚乳が割れたり茶褐色の種子が増加する．私たちの研究室では，刈り取った穂を 1 個体ごとに束ねて，ガラス温室（28～30℃）内に設置した金属網の上で 1 週間から 10 日かけて乾燥してから脱穀して保存している．100 粒の重さ（百粒重）と得られた全種子の重さを測定することによって種子の概数が計算できる．種子は個体ごとに封筒に入れ，それをシリカゲルの入った密閉容器に収めて保存している．1 年未満の短期保存の場合は室温でもよいが，長期保存を考えるならば 10℃以下に設定された低温室で保管することが望ましい．乾燥状態を保つために，毎年，保存容器のシリカゲルは交換すること．低湿度でかつ低温で保管することが出来れば，10 年以上にわたって高い発芽率を保つことが示されている[25]．

最後に，野生イネの場合の注意点を述べる．野生イネ

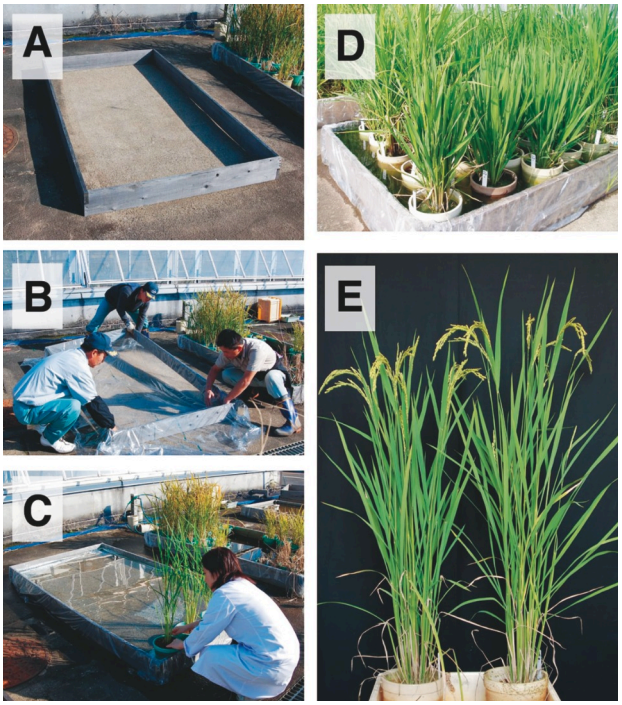



図4：プール育苗の手順　A：木枠を設置したところ．木枠にビニールを敷いて（B），完成後に水を張って植物を設置する（C）．D：7月末に撮影したプールの様子．E：プールで育てたイネ（日本晴）の草姿．左が株間 25 cm（標準）で，右が株間 18 cm（密殖状態）で育てたもの．分げつ（枝）の数は，標準が 21 本，密植が 15 本．標準個体からは 1355 粒採種できたが，密植個体からは 1085 粒しか取れなかった．株間 25 cm の方が，草姿が良く，多数の種子をつけることが明らかになった．

は他殖性が強く脱粒するものも多いので，穂が出てきたら袋掛けをすることが必要となる．この際，籾の表面にカビが生えやすくなるので，なるべく通気性の良い袋を選んだ方が良い．

### 8.4.4　無菌育苗

ここでは，イネを無菌的に発芽させ，幼苗を得る手法を説明する．種子の滅菌手順はカルスを誘導する時にも使うことができる．

**[準備]**

① 籾すり機（図5AB　実験規模に合わせて用意する．ごく少数の種子を扱う場合は，手やピンセットで籾を剝がすこともできる．）
② プラントボックス（図5C　マヨネーズ瓶などでも代用可能）．中に水寒天（0.4% agar 50 ml）を入れ，オートクレーブ滅菌しておく．
③ イネ種子
④ 70%エタノール，次亜塩素酸溶液，滅菌水，ピンセット，滅菌済み濾紙

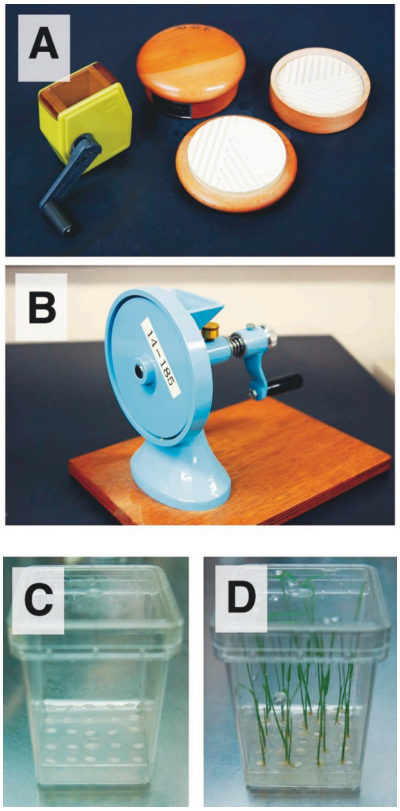



図5：無菌育苗の手順　A：1穂用籾すり機のいろいろ．右は，籾すり機を開いたところ．中に 100 粒程度の種子を入れて蓋をし，蓋を上から押さえつけながら回す．B：1株用籾すり機．1000～2000 粒の籾すりのための装置．上の皿に種子を投入しながら，ハンドルを回して籾すりを行う．C，D：無菌育苗の実例．Dは，プラントボックスに播種後 28℃白色光下で7日間栽培した時の状態．

**[発芽処理]**

籾すり機でイネ種子から籾を除去する．種子を 70%エタノールに1分間浸した後，2倍希釈した次亜塩素酸溶液に 15 分間 2 回浸漬して雑菌類を完全に死滅させる．滅菌処理が行き渡るように弱く撹拌しながら行った方がよい．クリーンベンチ内で滅菌水を用いて種子を洗浄し，種子の余分な水分を滅菌済み濾紙で吸い取った後に，プラントボックス内の水寒天培地上に置く（図5C）．0.4% agar は極めて柔らかいため，種子を埋め込まなくとも根は自然に培地中に入り込む（これよりも高濃度の水寒天培地や，ゲランガムなど固い培地を使う場合，種子を培地内にしっかりと埋め込まないと根は培地内に入り込まないので注意が必要である．）．

**[栽培]**

28℃白色光下など適当な条件で栽培する．筆者は，γ線で変異誘導した日本晴の M2 種子を上記の方法で発芽処理し，赤色光下 28℃で 7 日間栽培し，その時の幼葉鞘

(coleoptile) の長さの違いから *phyB* 変異株を単離することに成功した[26]. 幼苗で表現型解析する場合, 特に無菌的に解析をおこないたい時には良い実験系と考えている. なお, このように育てた個体も移植することができる.

## 8.5 おわりに

筆者は, 11 年前にイネとは無縁の研究室から農業生物資源研究所に移り, イネの研究を始めることになった. 以後, 自らの研究テーマの流れに従い, イネ幼苗を育て, そこからタンパク質を単離したり遺伝子を単離したり. 時には変異株を単離し, その系統を維持し, その系統の解析のために圃場に出たり, ついには交配を行ったりと, 少しずつイネの解析技術を体得して今日に至っている. これらの全ては, 数多くの方々から手取り足取り教えていただいた技術であり, お名前が書ききれないのが残念だが, 先ずは, その方々に感謝の気持ちを伝えたい.

この章は, これまでに得た知識を, 私に教えてくれた先輩同様に上手く伝えたいと思う気持ちから書き始めた. しかしながら, 書き進むにつれ, 根っからのイネ研究者でなく, 経験も豊富とは言えない立場であることを痛感し, 不安を覚える毎日であった. もしこれをきっかけにイネ栽培に取り組まれる方がいるとするならば, 私としてもコミュニケーションを取りながら, より良い栽培法を模索して行けたらと思っている. このためには, ご経験者のコメント, アドバイスも大切と感じていて, これらをいただくことができるならば, さらにうれしいと思っているしだいである.

## 参考文献


1) 森島啓子「ポピュラー・サイエンス 237　野生イネへの旅」, 裳華房, 2001, p.2.
2) International Rice Genome Sequencing Project, Nature **436** (2005) p.793.
3) 江花薫子, 農業技術 61 (2006) p.113.
4) Y. Kojima, K. Ebana, S. Fukuoka, T. Nagamine, & M. Kawase, Breeding Sci. **55** (2005) p.431.
5) K. Ebana, Y. Kojima, S. Fukuoka, T. Nagamine, & M. Kawase, Breeding Sci. **58** (2008) p.281.
6) 山本敏央, 矢野昌裕, 科学 **77** (2007) p.607.
7) 矢野昌裕, 育種学研究 **9** (2007) p.135.
8) 服部洋子, 芦苅基行, 蛋白質　核酸　酵素 **53** (2008) p.1881.
9) 矢野昌裕「改訂 3 版　モデル植物の実験プロトコール イネ・シロイヌナズナ・ミヤコグサ編」, 秀潤社, 2005, p.53.
10) M. Yano, S. Kojima, Y. Takahashi, H. Lin, & T. Sasaki, Plant Physiol. **127** (2001) p.1425.
11) S. Konishi, T. Izawa, S. Y. Lin, K. Ebana, Y. Fukuta, T. Sasaki, & M. Yano. Science **312** (2006) p.1392.
12) Y. Takeuchi, T. Ebitani, T. Yamamoto, H. Sato, H. Ohta, H. Hirabayashi, H. Kato, I. Ando, H. Nemoto, T. Imbe, & M. Yano, Breeding Sci. **56** (2006) p.405.
13) T. Suzuki, M. Eiguchi, T. Kumamaru, H. Satoh, H. Matsusaka, K. Moriguchi, Y. Nagato, & N. Kurata, Mol. Gen. Genet. **279** (2008) p.213.
14) A. J. Slade, S. I. Fuerstenberg, D. Loeffler, M. N. Steine, & D. Facciotti, Nature Biotech. **23** (2005) p.75.
15) H. Hirochika, K. Sugimoto, Y. Otsuki, H. Tsugawa, & M. Kanda, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **93** (1996) p.7783.
16) A. Miyao, K. Tanaka, K. Murata, H. Sawaki, S. Takeda, K. Abe, Y. Shinozuka, K. Onosato, & H. Hirochika, Plant Cell **15** (2003) p.1771.
17) D. H. Jeong, S. An, H. G. Kang, S. Moon, J. J. Han, S. Park, H. S. Lee, K. An, & G. An, Plant Physiol. **130** (2002) p.1636.
18) S. An, S. Park, D. H. Jeong, D. Y. Lee, H. G. Kang, J. H. Yu, J. Hu, S. R. Kim, Y. H. Kim, M. Lee, S. Han, S. J. Kim, J. Yang, E. Kim, S. J. Wi, H. S. Chung, J. P. Hong, V. Choe, H. K. Lee, J. H. Choi, J. Nam, S. R. Kim, P. B. Park, K. Y. Park, W. T. Kim, S. Choe, C. B. Lee, & G. An, Plant Physiol. **133** (2003) p.2040.
19) C. H. Ryu, J. H. You, H. G. Kang, J. Hur, Y. H. Kim, M. J. Han, K. An, B. C. Chung, C. H. Lee, & G. An, Plant Mol. Biol. **54** (2004) p.489.
20) D. H. Jeong, S. An, S. Park, H. G. Kang, G. G. Park, S. R. Kim, J. Sim, Y. O. Kim, M. K. Kim, S. R. Kim, J. Kim, M. Shin, M. Jung, & G. An, Plant J. **45** (2006) p.123.
21) 奥野員敏「改訂 3 版　モデル植物の実験プロトコール イネ・シロイヌナズナ・ミヤコグサ編」, 秀潤社, (2005) p.30.
22) 堀江武「農学基礎セミナー　新版　作物栽培の基礎」, 農山漁村分化協会, (2004)
23) 蓬原雄三「UP BIOLOGY　イネの育種学」, 東京大学出版会, (1990) p.69.
24) K. Ikeda, JARQ, **18** (1985) p.164.
25) 椎名次男, 江花薫子, 坂口進, 生物研研究資料 **16** (2001) p.1.
26) M. Takano, N. Inagaki, X. Xie, N. Yuzurihara, F. Hihara, T. Ishizuka, M. Yano, M. Nishimura, A. Miyao, H. Hirochika, & T. Shinomura, Plant Cell **17** (2005) p.3311.

# 9．藻類

村上　明男[1)]，小檜山篤志[2)]

藻類は，多様な光合成色素，単純な体制，均質な細胞が取得可能，などの特徴が活かされ，酸素発生型光合成の研究に大きく貢献している．本章では，光合成研究における藻類の活用法を紹介する．

## Algae

Akio Murakami, Atsushi Kobiyama

Algae, which are an important primary producer in aquatic habitat, consist of phylogenetically-various groups of oxygenic photoautotroph. In this chapter, we introduce the techniques to utilize algae in photosynthetic study; maintenance of algal strains, preparation of culture media, usage of culture instruments/devices, and conditions to control algal growth.

### 9.1　藻類を活かした光合成研究

藻類は，分類群ごとに光合成色素の組成が異なる他，細胞の体制（単細胞，糸状体・葉状体などの多細胞，茎状部や葉状部等の器官分化）やサイズ（1 μm 程度のピコプランクトンから体長 50 m 以上の大型褐藻類）などの多様性に富み，生育環境（淡水，汽水，海水，土壌，岩上，無脊椎動物や菌類との共生，強酸性・高温・高塩・温泉などの特殊環境）も広範囲に及ぶ[1,2)]．約 10 の門から構成される藻類の分類は，光合成色素の組成を基準としている．光合成色素（クロロフィル・カロテノイド／キサントフィル・フィコビリン）の宝庫でもある藻類は，アンテナ色素系をはじめ，光化学反応中心，電子伝達系，酸素発生系，さらに炭素固定反応の研究に幅広く活用され，酸素発生型光合成の解明に大きく貢献してきた[3)]．また，光や栄養物などの水環境特有の環境要因に対する適応・応答の解明は藻類ならではの研究テーマでもある．

単細胞の微細藻類（緑藻 *Chlorella*/*Chlamydomonas*/*Senedesmus*/*Dunalliella*，ユーグレナ藻 *Euglena*，紅藻 *Porphyridium*/*Rhodella*/*Cyanidiumm*/*Galdieria*，黄金色藻 *Ochromonas*，珪藻 *Chaetocerus*/*Nitschia*）は，微生物学的培養法の適用により増殖ステージが揃った均質な細胞を得ることができ，光合成の生理学，生化学，遺伝学などの研究に用いられてきた[4,5)]．また，突然変異株や従属栄養培養の可能な藻株も活用され，大量培養法や同調培養法も開発されている．一方，多細胞体制の大型藻類（アオサ藻 *Bryopsis*/*Codium*/*Ulva*/*Acetabularia*，褐藻 *Sarugassum*/*Ecklonia*/*Scytosiphon*，紅藻 *Porphyra*/*Aglaothamnion*/*Anthithamnion*）も，それぞれの特色（色素系，葉状体，多核体など）が活かされ利用されてきた．

多くのシアノバクテリア（ラン藻）でゲノムが公開されているが，単細胞の緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii*，*Ostreococcus tauri*，紅藻 *Cyanidioshyzon merolae*，珪藻 *Thallassiorsira pseudonata*，*Phaeodactylum tricornutam* においても全ゲノムが解明されている．また，葉緑体（プラスチド）ゲノムについては，他の分類群の藻類（ユーグレナ藻，クロララクニオン藻，クリプト藻など）でも報告されている．一方，大型藻の褐藻 *Ectocarpuas siliculasus* や紅藻 *Porphyra yezoensis* においてもようやくゲノム解析が開始され，形質転換系などの開発も並行して進められている．これらのゲノム情報を光合成研究に活用するためにも藻類の培養に関する技術の習熟は不可欠である．

### 9.2　藻株の入手

藻株は国内外のカルチャーコレクションから購入する方法が一般的であるが，株を分離した研究者へ分譲依頼することも可能である．また，大型藻の場合はフィールドで採集した藻体を用いることも有用である．

国内外には微細藻を中心とした藻類のカルチャーコレクションが設置されている（表 1）．広範囲の分類群の藻株を収集している分譲機関や特定の分類群の藻株だけを収集している分譲機関など，それぞれ特徴がある．各カ

1）神戸大学・自然科学系先端融合研究環・内海域環境教育研究センター
2）北里大学・海洋生命科学部

**表 1**：国内外の藻類カルチャーコレクションのリスト　　2008 年 11 月現在

| コレクション名 | 特徴 | URL |
|---|---|---|
| 国立環境研究所　微生物系統保存施設（NIES） | 微細藻約 1000 株．1958 年創設の IAM 株（旧東大応微研）を 2007 年に移管 | http://mcc.nies.go.jp/top.jsp |
| 製品評価技術基盤機構（NITE）── 生物遺伝資源部門（NBRC） | ㈱海洋バイオテクノロジー研究所（MBIC）収集の海産微細藻 270 株を移管 | http://www.nbrc.nite.go.jp/070328.html |
| 神戸大学　海藻類系統株コレクション（KU-MACC） | 海産の大型藻（褐藻，紅藻，緑藻，他）約 500 株 | http://www.research.kobe-u.ac.jp/rcis-ku-macc/ |
| Provasoli-Guillard National Center for Culture of Marine Phytoplankton（CCMP） | 海産のシアノバクテリアと微細藻約 2500 株 | https://ccmp.bigelow.org/ |
| Culture Collection of Algae and Protozoa（CCAP） | EG Pringsheim の藻株をもとに創設．藻類と原生生物約 2500 株．UTEX や SAG の基礎 | http://www.ccap.ac.uk/ |
| CSIRO Collection of Living Microalgae | 海産と淡水産の微細藻約 800 株 | http://www.marine.csiro.au/algaedb/default.htm |
| Pasteur Culture Collection of Cyanobacteria（PCC） | シアノバクテリア | http://www.pasteur.fr/recherche/banques/PCC/ |
| Sammlung von Algenkulturen der Universität Göttingen（SAG） | シアノバクテリアと微細藻約 2200 株 | http://www.epsag.uni-goettingen.de/html/sag.html |
| The Culture Collection of Algae at The University of Texas（UTEX） | RC Starr が創設．Indiana 大から移管．微細藻を中心に約 3000 株．1 L 培養の細胞も供給 | http://www.utex.org/ |
| ATCC The Global Bioresource Center | 微藻類．微生物や培養細胞等のバイオリソースを扱う研究機関 | http://www.atcc.org/ |
| Canadian Center for the Culture of Microorganisms（CCCM） | 海産微細藻が中心（淡水産約 60 株含む） | http://www3.botany.ubc.ca/cccm/ |
| Canadian Phycological Culture Centre（CPCC） | Tronto 大から移管した微細藻とシアノバクテリア約 500 株 | http://www.phycol.ca/ |
| Roscoff Culture Collection（RCC） | Roscoff 臨海実験所．海産の微細藻とシアノバクテリア約 1300 株 | http://www.sb-roscoff.fr/Phyto/RCC/ |
| Culture Collection of Microorganisms from Extreme Environments（CCMEE） | 極限環境（砂漠，温泉，高塩，酸性など）の微生物（微細藻とシアノバクテリアを含む） | http://cultures.uoregon.edu/default.htm |
| Culture Collection of Algae of Charles University of Prague（CAUP） | シアノバクテリアと微細藻約 200 株 | http://botany.natur.cuni.cz/algo/caup.html |
| Culture Collection of Algal Laboratory（CCALA） | チェコ科学アカデミー．微細藻とシアノバクテリア約 500 株 | http://www.butbn.cas.cz/ccala/index.php |
| Microalgal Culture Collection of the University of Caen | 海産，汽水産，淡水産の微細藻約 380 株 | http://www.unicaen.fr/ufr/ibfa/algobank/ |
| Culture Collection of Algae at the University of Cologne（CCAC） | 微細藻約 1800 株．Algenkultur-Sammlung Wien（ASW）株も移管 | http://www.ccac.uni-koeln.de/ |
| Culture collection of Algae | Marburg 大，微細藻とシアノバクテリア | http://staff-www.uni-marburg.de/~cellbio/welcomeframe.html |
| Scandinavian Culture Centre for Algae and Protozoa（SCCAP） | Copenhagen 大，微細藻約 600 株 | http://www.sccap.bot.ku.dk/ |
| ACOI Coimbra Collection of Algae | Coimbra 大，微細藻約 1500 株 | http://www1.ci.uc.pt/botanica/ACOI.htm |
| The Chlamydomonas Center culture collection | 緑藻 *Chlamydomonas* 株専門 | http://www.chlamy.org/strains.html |
| Dunaliella Culture Collection at Brooklyn College | 緑藻 *Dunaliella* 属約 40 株 | http://www.dunaliella.org/dccbc/ |
| Antarctic Protist Culture Collection at Woods Hole | 南極 Ross Sea 産の微細藻（分譲の可否は不明） | http://www.whoi.edu/science/B/protists/ |
| Loras College Freshwater Diatom Culture Collection | 淡水産珪藻（分譲の可否は不明） | http://www.bgsu.edu/departments/biology/facilities/algae/html/DiatomCulture.html |

ルチャーコレクションは，保存株のリストをホームページ上で公開している．ホームページには，各藻株についての学名・株番号のほか，産地，特徴，培地，培養条件などの情報，さらに分譲・購入の手続き，価格，契約事項などが掲載されている．コレクションによっては藻株ばかりでなく，大量培養した細胞ペレットやDNA/RNAなどの注文を受け付ける．文部科学省のナショナルバイオリソースプロジェクトに参画した国内機関が収集している藻株の情報は，〝Algae Resource Database〟として公開されている（http://www.shigen.nig.ac.jp/algae/top.jsp）．

購入した株の取扱いについては，契約事項を遵守しなければならない（第三者への再分譲・販売を禁止している機関もある）．分譲価格は藻株の維持管理の手間などから判断すると適正な設定である．ほとんどの分譲機関は少人数の研究者・キュレーターのボランティア的活動で維持され，運用資金や人材の確保に苦労していることが多い．コレクションの閉鎖や機器の故障により，長年維持してきた株が散逸・喪失した事例もある．最近は，凍結保存法の開発も行なわれ一部の藻株では成功しているが，まだ藻類全般に通用する保存法にはなっていない．そのため，分譲機関間で藻株を交換することで藻株の喪失リスクを低減させているケースもある．特に，培養が不安定な藻株の維持においては重要な対応と思われる．

微細藻の場合は，見た目はもちろんのこと顕微鏡レベルでも判別不能なことが多い．このような藻株を維持する上での注意としては，株間のコンタミや株の取り違いのミスを避けるための工夫である．また，不要になった藻株の廃棄にあたって，自然界に放出・漏洩させないよう処理する．毒性物質を生成する種ではもちろんのこと，生態系保護の観点からも重要な点である．現に，地中海の水族館から漏出した熱帯起源の海藻が周辺海域の在来種を駆逐していることが報告されている．なお，分譲株を用いた研究での成果（論文）を分譲機関へ報告することも大切である．各コレクションでは藻株毎の文献情報を収集・公開している場合もあり，研究成果の宣伝やコレクションの支援にもつながる．

海藻などの大型藻類も，特有の光合成色素や色素タンパク質の精製や多核体（緑藻カサノリ *Acetabularia* やハネモ *Bryopsis*）の特徴を活かした未損傷葉緑体の単離に活用されてきた．しかし，大型藻の実験室での培養は時間と手間を要することが多く大量培養は困難である．そのため，大型藻などの場合は野外に生育する自然藻体を用いることも多い．野外採集にあたっては，資源や生態系の保護に留意する必要がある．特に，食用海藻などの水産資源は漁業権の対象にもなっているので，採集に際し漁業協同組合などへの許可申請なども必要である．養殖のワカメやノリなどは加工前の生の藻体を栽培業者から購入することも可能である．なお，繁殖に季節性がある大型藻を通年入手することは困難なので，計画的な実験が必要となる．

野外採集ではラボとは次元の異なる危険が伴うので，周到な準備が必要である．日本生態学会のホームページ掲載の「野外調査の安全マニュアル（案）」や東京大学が公開している「野外活動における安全衛生管理・事故防止指針」などを参考に安全対策を講ずる．

## 9.3 培養の基本

カルチャーコレクションから藻株を購入する際には，各コレクションで使用している培地名（組成や作成法）や培養条件（光強度や温度）なども提供される．しかし，培地の種類は，各分譲機関や研究者が経験的に選択しているため，同じ藻株でも異なる培地が使用されていることもある．また，実験の目的に応じて培地や組成の一部を変更する必要もある．培養に用いる機器や光源などについては文献などを参照するとともに，最新の培養器具などを取り入れていくと良い．なお，藻株の分離や培養法などの藻類についての多岐にわたる実験手法については多くの成書が刊行されている[6−14]．各成書にはそれぞれ特色があるので，研究の目的に応じて参照することを薦める．

### 9.3.1 培地

培地の作成にあたっては，成分毎の保存液の作成や培地の作成順序などに注意する．細菌やカビの混入を防ぐため，培地や培養器具は原則的に滅菌処理する．培地の滅菌はオートクレーブが基本であるが，沈殿物の生成や有機物の変質を防ぐためには，培地成分をいくつかに分けて滅菌した後，クリーンベンチや無菌箱で混合することもある．海産藻類の培地は，天然海水あるいは人工海水をベースに各栄養塩を添加して作成する．海水を採水する際には，河川水や降雨の混入に注意し海水の塩濃度は必ず確認する．また，市販の人工海水を利用する場合は，品質や継続した供給に留意する．海水をオートクレーブすると少量の沈殿物が生成する．藻株の生育に問題が生じた場合には，面倒でも濾過滅菌（0.22 $\mu$m ポアサイズのメンブレンフィルターを使用）を行なう．多くの培養実験は光独立栄養で行うため無機培地を用いるが，従属栄養培養あるいは光従属栄養培養ではグルコースなどの有機物を培地に添加する．また，藻株によってビタミ

ン類の添加も必要である．添加する有機物やビタミンの種類や濃度は文献を参照する．

### 9.3.2 器具

培養に使用する容器は，シャーレ，試験管，培養フラスコ，特殊形状の培養瓶，など市販品から特注品まで研究者の好み，培養の規模，実験目的に応じて使いわける．オートクレーブ滅菌(例：120℃，20 分)や乾熱滅菌(例：150℃，3 時間)を行うため，培養容器は耐熱ガラス製が好ましい．特殊な培地の使用や大容量の培養では，オートクレーブ可能な透明ポリカーボネート製の容器を用いる．また，培養細胞用の滅菌済プラスチック器具（多穴プレートや扁平培養フラスコなど）は培養経過の顕微鏡観察など藻類の培養にも活用できる．植え継ぎ用のガラスピペットなどは乾熱滅菌する．ポリカーボネート製以外のプラスチック製品はオートクレーブ滅菌できないことが多い．

### 9.3.3 光・温度・攪拌

培養用の光源として，蛍光灯（白色，昼光色など）が用いられることが多いが，白熱電球が有効な場合もある．大量培養などの際の広面積照射では，高圧ナトリウムランプやメタルハライドランプを用いることもある．蛍光灯は様々な発光特性（波長分布）をもつ種類が市販されているので，カタログ等で確認する．発光ダイオード(LED)や冷陰極管なども培養に使用されているが，既製品は高価で融通性が低い．培養光の色（波長組成）を変える場合は，光学フィルター（色ガラス製，プラスチック製）を各種の光源と組み合わせて用いる．長寿命のランプが開発されているが，時間とともに劣化するので光強度は定期的に確認する．

培養温度の設定は文献や分譲機関からの情報を参考にする．光源による熱の影響を避けるためには，培養瓶を恒温水槽に入れて培養すると温度を安定に保つことが出来る．最近は，温度安定性が向上した培養庫（インキュベータ）を使うことが多いが，光源の種類や設置場所を変更する際には注意が必要である．保存培養では，至適温度より 5 ℃程度低めに設定することが多い．

培養液中の藻を均一に懸濁し，藻の沈殿を防ぐため培養液を撹拌する．スターラーでの培地撹拌，培養容器の振とう，培地のエアレーションなど，藻株の特性に応じて選択する．エアレーションでは，エアポンプ（コンプレッサー）からの配管にエアフィルターを挿入し細菌の混入を防止する．二酸化炭素濃度を変える実験では，ガスボンベからの二酸化炭素を空気と混合して供給する．二酸化炭素濃度は流量計で調節し，必要に応じて実測する．なお，培養途中での培地の pH 変動や蒸発による培地の濃縮などにも注意する．

### 9.3.4 増殖・収穫・破砕

微細藻の増殖速度の測定は，細胞数(血球計算盤，コールターカウンターで計測)，濁度（分光光度計で測定)，クロロフィル量（色素抽出液を分光光度計で定量）などの指標を使いわける．大型藻では葉面積や生重量などの指標も用いる．

微細藻の収穫では遠心沈澱とフィルター濾過を細胞サイズに応じて使い分ける．いずれの方法でも迅速に回収することで細胞へのダメージを最小限にする．遠心回収した細胞は新鮮培地や緩衝液での再懸濁により洗う．

微細藻類の細胞からチラコイド膜を分取するためには，超音波，フレンチプレス，パープレスなどを用いて細胞を破砕する．小規模の細胞破砕ではガラスビーズ法を用いることが多いが，他の方法に較べ破砕効率が低い．大型藻の場合でも，予め藻体を小さく切り刻むことでこれらの方法が適用できる．

## 9.4 微細藻の培養

購入した藻株は，少量の液体培地あるいは寒天上の小コロニーとして送付されてくることが多い．輸送中のストレスで弱っているので，直ちに新鮮な培地に植え継ぐ．野外採集した藻から得たクローン培養株は二度と入手できないことが多いので，絶やさないように維持する．ここでは，珪藻や渦鞭毛藻を例にあげ，微細藻類培養株の維持と各種の培養法について紹介する．

### 9.4.1 保存培養

藻株を絶やさないように，実験培養とは別に保存培養(元種培養)として維持する．微細藻は通常は無性的に二分裂で増殖するため，新鮮培地への植え継ぎを繰り返すことで藻株を維持する．珪藻は細胞分裂の度に被殻が小型化し細胞内小器官を維持できなくなるため，有性生殖により増大胞子を形成させ細胞サイズを回復させる．また，凍結保存法も開発されているが一部の藻株を除いて未確立であり，一般的には適用できない．

微細藻の継代培養では固形寒天培地や液体培地を用いるが，寒天培地では生育しない藻株もいる．寒天培地で培養できる微細藻（例：渦鞭毛藻 *Symbiodinium*）では，クローン株の確立や無菌化が容易である[15]．しかし，多くの微細藻（例：渦鞭毛藻 *Alexandrium*）は寒天培地では増殖できない．

海産微細藻用として，SWII 培地[16]，$T_1$ 培地[17]，f/2 培地[18]，ダイゴ IMK 培地（日本製薬）等の天然海水をベースにした培地の他，ASP 培地[19] や Aquil 培地[20] 等の人

工海水培地も開発されている．各培地は生物種や研究目的に合わせて選択する．培地の種類により増殖速度は速いが細胞密度が濃くならない，反対に増殖は遅いが高密度になるものがある．長期間保存の場合など，光量や温度を至適条件から下げて増殖速度を遅くさせ，継代間隔を長くすることも可能である．例えば，生存の温度範囲が広い広温性株では，20℃では１～２週間毎の継代が必要であるが，４℃では１～２ヶ月間隔で十分な場合もある．藻株によって光・温度の許容範囲が異なるため，培養の状態が安定した後に条件検討する．

休眠細胞を形成する藻株の場合，休眠細胞での長期保存が可能である．渦鞭毛藻や珪藻の休眠細胞は，５℃，暗所で20ヵ月以上の生存が確認されている．また，珪藻の栄養細胞でも２～３ヵ月は生存する[21]．休眠細胞の発芽は，増殖培地へ移し光や温度を至適条件にすることで行う．休眠細胞は有性生殖の結果生じるので，異なる交配型の栄養細胞をもつ種ではクローン株での維持はできない．休眠細胞から発芽した後，交配型の異なる栄養細胞へと分化する株もあることから，クローン株の維持および異なる交配型の細胞を得るには休眠細胞から発芽(分裂)後の細胞をキャピラリーで一個ずつ拾い再培養する．このように，微細藻の保存培養を行う上でも生活環の理解が必要である．海藻（大型藻）の生活環では配偶体と胞子体の世代を交互に繰り返すが，微細藻の生活環には栄養細胞が二分裂する無性生殖と配偶子接合による有性生殖の過程が含まれる．有性生殖の形式も種により異なり，単一クローン細胞から生じた細胞間で有性生殖するホモタリックな種と異なる交配型のクローン間で有性生殖するヘテロタリックな種が存在する．

継代培養による藻株の保存では日常的な観察が必須である．培養株への細菌の混入による藻株の衰弱・死滅などの異常を早く察知し，培地の作り直しや植え継ぎなどの対応を速やかに行う．天然海水を用いる場合，水質(塩濃度や溶存成分など）の微妙な違いが藻株の増殖に悪影響を与えることもある．

### 9.4.2　大量培養

藻体を実験に供する場合，保存培養規模の量（数mL）で十分な場合もあるが，タンパク質精製などの生化学実験では10Ｌ単位の大量培養(高密度培養)が必要となる．通常のラボの設備ではこの規模の培養が限界である．培養容器として，ガラス製の３Ｌ平底丸フラスコや５Ｌ三角フラスコ，あるいはポリカーボネート製の10Ｌ広口瓶を用いる．浮遊性の海産微細藻の大容量培養では，培養開始時の細胞密度の低さや光量不足のため小規模培養より増殖が悪くなることが多い．大量培養において高密度培養を維持するためには，培養光源(蛍光ランプの増加，高圧ナトリウムやメタルハライドなどの高輝度ランプへの変更）や照明方式（外照射から内照射への変更）などの工夫も必要となる．これに伴い，培養液の過熱対策(冷却ファンの使用）や省エネ対策（細胞密度に合わせた照度の調節）なども講ずる．

培養容器内の細胞や培地を均一に維持するため，エアレーションやスターラーなどにより撹拌する．

### 9.4.3　連続培養

上記のバッチ培養法では，増殖に伴い個々の細胞が受ける光条件や栄養状態が変わる．細胞の生理状態を安定に保つためには連続培養法（ケモスタット法，タービドスタット法)を採用する[22]．ケモスタット法では培養タンク内に培地を一定流量で供給することで，培地中の栄養条件を一定に保つ．この際，培地の窒素などの栄養分が増殖の制限要因になるように濃度を調節することで，細胞密度を一定に維持する．

タービドスタット法は，培養タンクへの培地の供給速度（培養液の希釈速度）を細胞の増殖速度に合わせることで，細胞密度を一定に保つ方法である．細胞密度を濁度で連続モニターし培地の供給速度をフィードバック制御して，細胞密度を調節する場合もある．連続培養装置の模式図を図１に示す．連続培養には，培養タンク，エアポンプ，シリコンチューブ，添加培地用のタンク，流速可変のポンプ，オーバーフローした培養液を回収するタンクなどが必要である．タンク類はオートクレーブ滅菌可能な材質の容器を使用する．また，各タンクのエアの出入口には細菌の混入防止用にエアフィルターを接続する．エアレーションの流量調節にも注意する．本法では，長期間にわたり細胞の状態を一定にした培養が可能で，阻害剤の添加実験などにも活用できる．

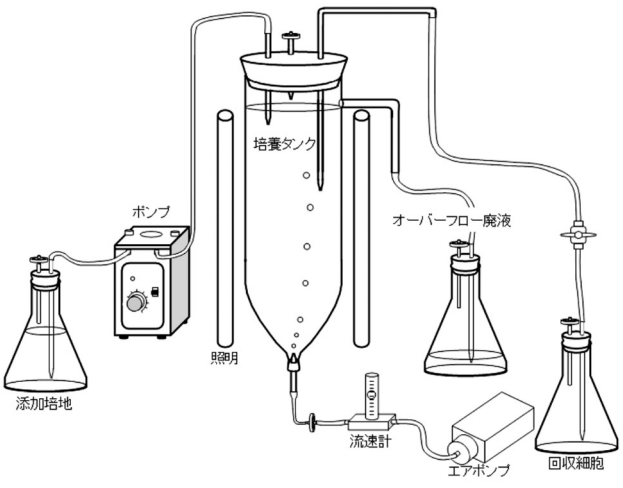



**図１**：連続培養装置の模式図

### 9.4.4 同調培養

細胞の生理状態をさらに均一に保つためには細胞周期の同調が必要である．藻類の同調培養においても，動物培養細胞で用いられている栄養成分の除去，あるいは成長調節物質や細胞分裂阻害剤（DNA 合成阻害剤等）の添加などの方法が適用できる．また，藻類では光が細胞周期の制御要因であるため，光周期を制御した同調法も利用されている．緑藻 *Chlamydomonas* では，12 時間明期－12 時間暗期の光条件による細胞周期の同調が報告されている[23]．珪藻 *Thalassiosira pseudonana* では，ASW 培地（ASWT）[24] 中のケイ素の欠乏－再添加による細胞周期の同調法が報告されている[25]．また，珪藻 *Seminavis robusta* では，対数増殖期の細胞を 24 時間暗所に置き，細胞周期を $G_1$ 期で停止させる同調法も報告されている[26]．

渦鞭毛藻では，細胞分裂の様態（染色体が常に凝集し核膜が消失しない）が他の藻類とは異なることもあり細胞周期に関する研究が遅れている．また，明期にだけ細胞の遊泳運動が見られる *Symbiodinium sp.* や明期－暗期を通して遊泳運動を継続する *Alexandrium tamarense* のような種が存在するため，渦鞭毛藻の細胞周期制御については個別の対応が必要である．*A. fundyense* では 82 時間の連続暗処理後に，通常の明暗周期に戻すことで同調させている[27]．また，*Crypthecodinium cohnii* では，寒天培地培養した細胞を液体培地で洗浄し遊離した細胞をメンブレンフィルター（10 $\mu$m ポアサイズ）でろ過することで，$G_1$ 期の遊泳細胞を得ている[28]．さらに，薬剤（ヒドロキシ尿素や 2，6-ジクロロベンゾニトリル）処理による $G_1$ 期での細胞周期停止も報告されている[29]．

## 9.5 大型藻の課題

大型藻は微細藻よりも培養が難しく実験室での成長速度も遅いため，光合成研究で使われることは少ない．大型藻を生化学や生理学実験などに用いるためには，組織や細胞に含まれる粘性多糖類の対策や複雑な形態や生活史の理解も必要である．海洋の環境や生態系を理解する上からも，石灰藻（紅藻，アオサ藻の一部）も含めた大型藻の光合成研究を進める必要が高くなっている．

## 参考文献


1）井上勲「藻類 30 億年の自然史 ── 藻類からみる生物進化・地球・環境」第 2 版，東海大学出版会，2007，p.643
2）R. E. Lee, Phycology, 4th ed. Cambridge University Press, 2008, p.560.
3）三室守，土屋徹「光合成微生物の系統・多様性とその反応系」「光合成微生物の基礎と応用：上原赫編」シーエムシー出版　2006，p.1
4）大城香「シアノバクテリア」「光合成微生物の基礎と応用：上原赫編」シーエムシー出版　2006，p.102
5）村上明男「藻類」「光合成微生物の基礎と応用：上原赫編」シーエムシー出版　2006，p.116
6）岩崎秀雄「微細藻類の分離と培養」日本水産資源保護協会　1967，p.56
7）田宮博・渡辺篤「藻類実験法」第 4 版　南江堂　1975，p.455
8）西沢一俊・千原光雄「藻類研究法」共立出版　1979，p.754
9）杉山純多他「微生物学実験法」新版　講談社サイエンティフィク　1999，p.324
10）有賀祐勝，田中次郎，吉田忠生，井上　勲「藻類学　実験・実習」講談社　2000，p.188
11）J. R. Stern, Handbook of Phycological Methods. Cambridge Univ. Press. 1973, p.448.
12）C. L. Loban et al. Experimental Phycology. Cambridge Uviv. Press. 1988, p.295.
13）A. Richmond, Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology, Blackwell, 2003, p.584.
14）R. A. Andersen, Algal Culturing Techniques, Academic Press, 2005, p.578.
15）M. Ishikura, K. Hagiwara, K. Takishita, M. Haga, K. Iwai, & T. Maruyama, Marine Biotech. **6** (2004) P.378.
16）H. Iwasaki, Biol. Bull. **121** (1961) P.173.
17）T. Ogata, T. Ishimaru, & M. Kodama, Mar. Biol. **95** (1987) P.217.
18）R. R. L. Guillard, & D. Ryther, Can. J. Microbiol. **8** (1962) P.229.
19）L. Provasoli, J. J. A. McLaughlin & M. R. Droop, Arch. Mikrobiol. **25** (1957) P.392.
20）N. M. Price, G. L. Harrison, J. G. Hering, R. J. Hudson, P. M. V. Nirel, B. Palenik, & F. M. M. Morel, Biol. Oceanogr. **6** (1989) P.443.
21）J. Lewis, A. S. D, Harris, K. J. Jones, & R. L. Edmonds, J. Plankton Res. **21** (1999) P.343.
22）I. Maeda,Y. Seto, S. Ueda, Y. Cheng, J. Hari, M. Kawase, H. Miyasaka & K. Yagi. Biotechnol. Bioengin. **94** (2006) P.722.
23）S. Surzycki, Methods Enzymol. **23** (1971) P.67.
24）W. M. Darley, & B. E. Volcani, Exp. Cell Res. **58** (1969) P.334.
25）L. G. Frigeri, T. R. Radabaugh, P. A. Haynes, & M. Hildebr, Mol. Cell. Proteomics **5** (2006) P.182.
26）J. Gillard, V. Devos, M. J. Huysman, L. De Veylder, S. D'Hondt, C. Martens, P. Vanormelingen, K. Vannerum, K. Sabbe, V. A. Chepurnov, D. Inzé, M. Vuylsteke, & W. Vyverman, Plant Physiol. **148** (2008) P.1394.
27）G. Taroncher-Oldenburg, D. M. Kulis, & D. M. Ander-

son, Limnol. Oceanogr. **42** (1997) P.1178.
28) J. T. Y. Wong, & A. Whiteley, J. Exp. Mar. Biol. Ecol. **197** (1975) P.91.
29) C. M. Kwok, & J. T. Y. Wong, Plant Physiol. **131** (2003) P.1681.

# 10. 紅藻の培養，入手

榎並　　勲[1)]

ここでは，紅藻の中で，私たちが光合成の研究材料として用いてきた紅藻 *Cyanidium caldarium*（シアニジウム）とその近縁種である *Cyanidioschyzon merolae*（略してシゾンと呼ぶ）の培養法と入手法について紹介する．これらの紅藻は，世界各地の酸性温泉に生息し，pH 1〜3 の酸性領域で増殖し，中性 pH では増殖できない好酸性，好熱性の単細胞藻である．光合成色素としては，クロロフィル *a*，カロチノイドと青色のフィコシアニン，アロフィコシアニンをもつが，紅色のフィコエリスリンはもたないため，ラン色細菌に似た青緑色をしているが，細胞内に 1 個の葉緑体とミトコンドリア，核をもつ真核生物で，原始的な紅藻と考えられている．

## Culture and acquisition of red algae

Isao Enami

In this chapter, culture and acquisition of red algae, *Cyanidium caldarium* and *Cyanidioschyzon merolae*, were described.

## 10.1 *Cyanidium caldarium*（シアニジウム）

私たちが培養しているシアニジウムは草津温泉から採集した株である．シアニジウム細胞は，強固な厚い細胞壁をもち，4 個の内生胞子を作り増殖する．後で述べるシゾン細胞に比べ，温度などの環境変化に対して強い．外液 pH が強酸性であるにもかかわらず，細胞内 pH は強力なプロトンポンプの働きにより中性に保持されていることが分っている[1,2)]．しかし，好酸機構（なぜ中性 pH では増殖できないか）については不明のままである．すでに，高い酸素発生能をもつ系 II が精製されており[3)]，その結晶構造解析が進行中である[4)]（4．タンパク質複合体の単離　b．系 II 参照）．

### [培養方法と入手法]

表 1 に示す培養液[5)]を調製し，オートクレイブで滅菌する．少し濃い目に植え継いだ方が培養しやすい．薄く植え継ぐと，最初は弱い光強度で培養する必要がある．通常は，30〜50 $\mu$mol photon $m^{-2}s^{-1}$ の蛍光灯照射下で培養している．約 40°Cで，5％　$CO_2$ を含む空気をフィルター（Millex MILLIPORE）を通して強めにバブリングしながら 7〜10 日間培養してから，3,000 x g，5 分の遠心により細胞を回収する．なお，細胞が培養中に沈殿するのを防ぐためにスターラー攪拌しながら培養すると良い．最近，シゾンの培養に用いる表 2 に示す大量の無機栄養源を含む培養液を用いて，同様の培養条件で培養

**表 1**：*Cyanidium caldarium* の培養液組成（5 L）

| | |
|---|---|
| $CaCl_2$ | 0.9 g |
| $MgCl_2$ | 0.9 g |
| $KH_2PO_4$ | 0.9 g |
| $(NH4)_2SO_4$ | 1.8 g |
| Microelement | 5 ml |

5 L の DW に上の無機塩から順に溶解した後，$H_2SO_4$ により pH を 2.5〜3.0 に合わせる．

Microelement の組成
それぞれ 2.6 g の $Co(NO_3)_2$，$CuSO_4$，$FeCl_3$，$MnCl_2$，$Na_2MoO_4$ を 1 L の DW に溶解する．

**表 2**：*Cyanidioschyzon merolae* の培養液組成（5 L）（2 x Allen's medium）

| | |
|---|---|
| $CaCl_2$ | 0.74 g |
| $MgCl_2$ | 2.46 g |
| $KH_2PO_4$ | 2.72 g |
| $(NH4)_2SO_4$ | 13.2 g |
| P4 metal | 20 mL |

5 L の DW に上の無機塩から順に溶解した後，$H_2SO_4$ により pH を 2.2〜2.5 に合わせる．

P4 metal の組成（1 L）
$CoCl_2$ 4 mg，$FeCl_3$ 196 mg，$MnCl_2$ 36 mg，$Na_2MoO_4$ 2.5 mg，$ZnSO_4$ 22.2 mg，$Na_2EDTA$ 1000 mg を 1 L の DW に溶解する．

1）東京理科大学理学部

すると，より早く増殖する結果を得ているので，表2の培養液を使用した方がよいかもしれない．なお，岡山大学の沈研究室では，系IIの結晶化標品調製のため，大きな水槽を用いて大量培養をしている．

シアニジウム株は国内外の藻類保存施設からも入手可能であるが，国内では岡山大学の沈研究室で大量培養しているので，生きの良い株が入手できる．

## 10.2 *Cyanidioschyzon merolae*（略してシゾンと呼ぶ）

シゾンは，立教大学の黒岩先生がイタリアの酸性温泉から採集された株である．シゾン細胞は，シアニジウム細胞と異なり，強固な細胞壁を持たず，2分裂で増殖する．25℃以下にすると細胞が破壊されるので，温度変化には注意が必要である．すでに，黒岩グループによりシゾンの全ゲノムが完全に解明されている[6]ので，プロテオーム解析などが可能である．また，シゾン細胞の同調培養系を用いて，葉緑体やミトコンドリアの分裂機構が解明された[7]．最近，シゾン細胞は凍結融解により簡単に細胞破壊でき，活性の高い系II，系Iが精製できることを我々は見出した．従って，シゾンは光合成の生化学的研究にも有用な材料と言える．

### [培養方法と入手法]

表2に示す培養液を調製し，オートクレイブで滅菌する．シゾンは温度変化に弱いので，植え継ぐ時に培養液を予め42℃付近に温めておく必要がある．濃い目に植え継いだ後，42℃で5％ $CO_2$ を含む空気をフィルター（Millex MILLIPORE）を通して強めにバブリングしながら，約100 $\mu$mol photon $m^{-2}s^{-1}$ の蛍光灯照射で培養する．7日間培養した後，3,000 x g，5分の遠心により細胞を回収する．低温で遠心すると細胞が壊れるので，細胞を壊さないように回収したい場合には，25℃以上の温度で遠心する必要がある．

なお，黒岩グループでは，12時間毎の明暗周期によりシゾン細胞の同調培養にも成功している[7]．濃い目に植え継いだ後，12時間明期，12時間暗期の繰り返しで，最初の細胞分裂が起こるのは18時間前後（1回目の暗期6時間目）で，2度目の分裂期が36〜37時間目（2回目の暗期直後から1時間程度）である．2回目の分裂で最も同調された細胞が得られるが，それ以降は，高い割合で同調することは難しい．

シゾン細胞は，立教大学の黒岩先生にお願いすれば，分与していただける．

## 参考文献


1）I. Enami, H. Akitsu, & Y. Kyogoku, Plant Cell Physiol. **27** (1986) P.1351.

2）H. Ohta, H. Shirakawa, K. Uchida, M. Yoshida, Y. Matuo, & I. Enami, Biochim. Biophys. Acta **1319** (1997) P.9.

3）I. Enami, H. Murayama, H. Ohta, M. Kamo, K. Nakazato, & J-R. Shen, Biochim. Biophy. Acta **1232** (1995) P. 208.

4）H. Adachi, Y. Umena, I. Enami, T. Henmi, N. Kamiya, & J-R. Shen, Biochim. Biophy. Acta in press.

5）I. Enami, & I. Fukuda, Plant Cell Physiol. **16** (1975) P. 211.

6）M. Matsuzaki, O. Misumi, T. Shin-i, S. Maruyama, M. Takahara, S. Miyagishima et al. Nature **428** (2004) P.653.

7）S. Miyagishima, R. Itoh, S. Aita, H. kuroiwa, & T. Kuroiwa, Planta **209** (1999) P.371.

# 11．珪藻の培養，入手

榎並　　勲[1)]

珪藻は，海洋，淡水の水域圏で最も豊富に存在する単細胞藻で，世界中の熱帯雨林に匹敵する光合成を行い，水域圏の生態系，炭素循環において最も重要な位置を占める植物プランクトンである．集光性色素タンパク質としてフコキサンチン・クロロフィル *a*/*c* 結合タンパク質（FCP）をもつため，黄色～褐色をしている．細胞の外に珪酸質の固い被殻をもつ．中心目と羽状目に分類される．すでに，中心目珪藻 *Thalassiosira pseudonana*（http://genome.jgi-psf.org/Thaps3/Thaps3.home.html）と羽状目珪藻 *Phaeodactylum tricornutum*（http://genome.jgi-psf.org/Phatr2/Phatr2.home.html）で全ゲノムが解明されている．
しかしながら，上述したように珪藻は水域圏の生態系，炭素循環において重要な位置を占めるにもかかわらず，珪藻の光合成の生化学的研究はこれまで皆無の状態であった．その大きな要因は，珪藻は固い珪酸質の殻をもつため，細胞破壊が困難であると考えられてきたことにある．しかし，最近，中心目珪藻は凍結融解により簡単に細胞破壊できることが見出され，活性のある系 I[1)] や系 II[2)] の精製にも成功しているので，今後，珪藻の光合成の生化学的研究も発展するものと期待している．そこで，我々が用いている中心目珪藻 *Chaetoceros gracilis* の培養法と入手法について紹介する．

## Culture and acquisition of diatoms

Isao Enami

In this chapter, culture and acquisition of a diatom, *Chaetoceros gracilis*, were described.

## 11.1　*Chaetoceros gracilis*

UTEX（http://www.utex.org/）から購入した中心目珪藻で，25℃の室温で，弱い光強度の下で簡単に培養できる．遠心すると細胞同士が衝突することにより細胞破壊することがあるので，注意が必要である．私たちは，フィルターを介して細胞回収する RELLICON（MILLIPORE）を使用している．

### [培養方法と入手法]

表 1 に培養液組成を示す．通常は 8 L のポリタンクを用いて培養しているので，その組成を示している．8 L の DW に人工海水（マリンテック社製）280 g とメタケイ酸ナトリウム 0.4 g を溶解し，オートクレーブで滅菌する．その培養液に 8 ml の藻類培養液 KW21（第一製鋼社製）（複合アミノ酸と複合ビタミンを含む）をフィルター（Millex, MILLIPORE）をセットしたピペットで入れる．通常は，濃い目に植え継いだ後，25℃，片面から 30～35 $\mu$mol photon $m^{-2}s^{-1}$ の蛍光灯照射下，細胞が沈殿しないように空気をフィルター（Millex, MILLIPORE）を通して強めにバブリングしながら，約 10 日間培養している．強光で培養すると酸素発生活性の低い系 II 標品しか精製できないので，弱い光強度で培養することが重要である．上述したように，細胞を遠心により回収すると細胞が破壊されるので，RELLICON（MILLIPORE）を用いて細胞回収するようにしている．

この株は，UTEX（http://www.utex.org/）から購入できるが，兵庫県立大学の菓子野博士が培養されているので，お願いすれば分与していただける．

なお，全ゲノムが解明された中心目珪藻 *Thalassiosira*

**表 1**：中心目珪藻 *Chaetoceros gracilis* の培養液組成（8 L）

| | |
|---|---|
| 人工海水（マリンテック社） | 280 g |
| $Na_2SiO_4$ | 0.4 g |

8 L の DW に溶解してから，オートクレーブで滅菌した後，藻類培養液 KW21（第一製鋼社）をフィルターを付けたピペットで 8 ml 入れる．

1）東京理科大学理学部

*pseudonana* と羽状目珪藻 *Phaeodactylum tricornutum* ともに UTEX（http://www.utex.org/）から購入できる．これらの珪藻も *Chaetoceros gracilis* で述べた方法により容易に培養できる．

## 参考文献


1）Y. Ikeda, M. Komura, M. Watanabe, C. Minami, H. Koike, S. Itoh, Y. Kashino, & K. Satoh, Biochim. Biophys. Acta **1777** (2008) P.351.

2）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.

# 2章

# 個体・環境の測定

# 1．個葉から葉緑体スケールのガス交換
## a. 個葉の光合成速度が決まるしくみと測定原理

彦坂　幸毅[1)]

光合成は光エネルギーを利用して $CO_2$ を糖にする代謝経路である．光合成速度（$CO_2$ 吸収速度）は様々な環境の影響を受ける．C 3 光合成では，気孔コンダクタンスや葉肉コンダクタンスによって葉緑体への $CO_2$ 供給能力が決まり，ルビスコのキネティクスによって光合成速度の $CO_2$ 濃度依存性が決まる．このような複雑な過程は物理・生化学に基づいて数理モデル化することができ，光合成速度の環境依存性を定量的に理解することが可能になっている．

## Modelling of photosynthetic rates in C3 plants

Kouki Hikosaka

Photosynthesis is a metabolism that converts $CO_2$ to sugars using light energy. Photosynthetic rate ($CO_2$ assimilation rate) is sensitive to various environmental factors. Stomatal and mesophyll conductance affects $CO_2$ supply to chloroplasts and Rubisco kinetics determines $CO_2$ response of $CO_2$ assimilation rates. Here we present the biochemical model of photosynthesis to understand environmental dependence of $CO_2$ assimilation rates.

### 1.a.1　はじめに

光合成速度は葉の環境，植物の生育環境，葉齢，種など様々な要因の影響を受ける．ここではC 3 植物の一枚の葉の光合成速度が環境の変化に対してどのように影響を受けるのか，物理的・生化学的なしくみを，数式を用いて説明する．また，重要なパラメータをどのように測定あるいは推定するのかを説明する．

### 1.a.2　C 3 光合成の概略

光合成は細胞内小器官の一種葉緑体で行われる．葉緑体の内部にはチラコイド膜とよばれる膜構造がある．チラコイド膜と包膜の間は液相の空間で，ストロマとよばれる．

チラコイド膜では，光エネルギーを駆動力として，電子伝達と ATP 合成が行われる．電子伝達系は水を分解して電子を取り出し，$NADP^+$ を還元して NADPH を生産する経路である．クロロフィルは光エネルギーを吸収して励起され，エネルギーを光化学系の反応中心に伝える．反応中心はエネルギーを受け取ると励起され，強い還元力を持つ．この還元力を利用し，$NADP^+$ が還元される（図 1）．なお，光合成において発生する酸素は，電子伝達系における水の分解産物である（$2H_2O \rightarrow 4H^+ + O_2 + 4e^-$）．

電子伝達系の構成要素の一つであるプラストキノンは，電子伝達の際にプロトン（$H^+$）をチラコイド膜の外側から内側に運搬する．これと水分解によるプロトンの生成により，チラコイド膜内外にプロトン濃度の勾配ができる．この濃度勾配をエネルギー源とし，プロトンがチラコイド膜の ATP 合成酵素を通過する際に ATP が合成される．

チラコイド膜で生産された ATP と NADPH は，それぞれ $CO_2$ 吸収のためのエネルギー源・還元力として，ストロマのカルビンサイクルで利用される．カルビンサイクルは，11 の酵素によって触媒される循環経路である（図 1）．$CO_2$ 吸収はリブロース二リン酸カルボキシラーゼ/オキシゲナーゼ（Rubisco）という酵素が触媒するカルボキシル化反応（carboxylation）によって行われる．$CO_2$ はリブロース二リン酸（RuBP）という 5 つの炭素をもつ糖リン酸に化合し，2 分子のホスホグリセリン酸（PGA）が生産される．

$$RuBP + CO_2 \rightarrow 2\,PGA \qquad (1)$$

PGA は 3 つの炭素をもつ有機酸リン酸である．PGA から，ATP と NADPH を消費してトリオースリン酸が生産される．このトリオースリン酸の一部が葉緑体の外（細胞質）に輸送され，ショ糖などの合成に利用される．

1）東北大生命科学研究科

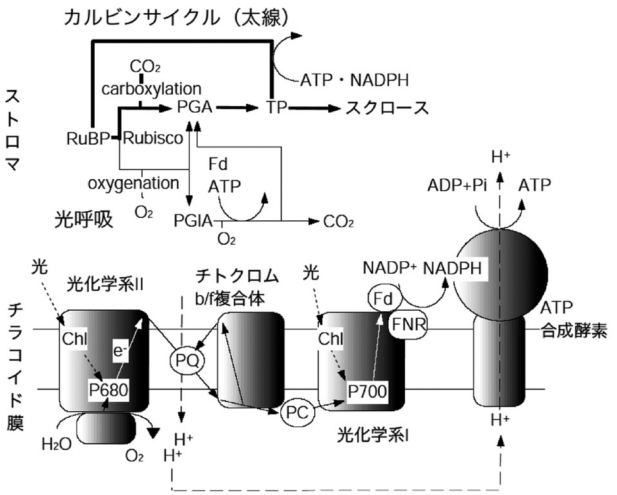



**図1**：光合成・光呼吸の模式図[9] チラコイド反応において，実線は電子の，点線はエネルギー（光エネルギーまたは励起エネルギー），破線はプロトン（H＋）の移動を示す．

チラコイド膜には4つの巨大なタンパク質複合体が存在する．光化学系II複合体のクロロフィル（chl）が光を吸収すると励起エネルギーが反応中心（P 680）に伝達される．P 680で励起された電子は反応中心を離れ，プラストキノン（PQ）に伝達される（光化学反応）．P 680が電子を失うと，光化学系IIで水が分解され，電子が供給される．PQは光化学系IIから電子を受け取ると同時に，チラコイド膜外側の $H^+$ と結合し，膜中を移動する．PQはチトクロムb/f複合体に電子を渡し，$H^+$ を膜内側に放出する．さらに電子はチトクロムb/f複合体からはプラストシアニン（PC）を経て光化学系I複合体の反応中心（P 700）に伝達される．光化学系Iでは光化学系II同様に光化学反応が起こり，電子がフェレドキシン（Fd）に伝達される．Fdはフェレドキシン-NADP酸化還元酵素（FNR）の触媒でNADP＋に電子を渡す．RuBP：リブロース二リン酸，Rubisco：RuBPカルボキシラーゼ/オキシゲナーゼ，PGA：ホスホグリセリン酸，TP：トリオースリン酸，PGlA：ホスホグリコール酸

残りのトリオースリン酸からは，ATPを消費してRuBPが再生され，再び炭酸同化反応が起こる．

Rubiscoはカルボキシル化反応だけでなく，RuBPの酸素化反応（oxygenation）も触媒する．

$$RuBP + O_2 \rightarrow PGA + ホスホグリコール酸 \qquad (2)$$

この反応の生成物の一つであるホスホグリコール酸からPGAを再生する過程が光呼吸（グリコール酸回路）である（図1）．光呼吸では還元力やATPを消費し，一度の酸素化反応あたり0.5分子の $CO_2$ が放出される．

光が当たっているときは，葉では光合成も光呼吸も同時に起こっている．通常大気条件では，カルボキシル化反応によって吸収された炭素の30〜50%が光呼吸によって放出されている．光呼吸がどれだけ起こるかは，葉緑体中の $CO_2$ と $O_2$ の濃度に依存する．Rubiscoが触媒する反応では，まずRubiscoにRuBPが結合する．葉緑体中の $CO_2$ 濃度が相対的に高ければ，Rubisco-RuBP複合体に $CO_2$ が結合し，カルボキシル化反応が起こりやすい．逆に，$O_2$ 濃度が高ければ酸素化反応が起こりやすい．これらのキネティクスは後述するFarquharらのモデル[1,2]によって定量的に記述される．

## 1.a.3 Farquharらの光合成生化学モデル

$CO_2$ 吸収速度 $A$ は以下の式で表される．

$$A = V_c - 0.5\,V_o - R_d \qquad (3)$$

$V_c$ と $V_o$ はそれぞれカルボキシル化反応と酸素化反応の速度である．$V_o$ の係数0.5は，一度の酸素化反応あたり0.5の $CO_2$ が放出されることを意味する．$R_d$ はミトコンドリア呼吸（日呼吸）の速度である．$CO_2$ 吸収速度と $CO_2$ 濃度の関係は，一本の式で示すと非常に複雑になる．便宜的に，RuBPが飽和している場合（$W_c$）とRuBP供給が光合成を律速している場合（$W_j$）の二つに分けて表される．

### ・RuBPが飽和している場合

Rubiscoが触媒する反応では，$CO_2$ と $O_2$ はそれぞれ酸素化反応とカルボキシル化反応を競合的に阻害する．RuBPが飽和している場合，この関係は生化学的に以下のような式で表すことができる．

$$V_c = \frac{V_{c\max} C}{C + K_c(1 + O/K_o)} \qquad (4)$$

$$V_o = \frac{V_{o\max} O}{O + K_o(1 + C/K_c)} \qquad (5)$$

ここで $V_{c\max}$ と $V_{o\max}$ はそれぞれカルボキシル化反応と酸素化反応の最大速度，$C$ と $O$ はそれぞれ $CO_2$ と $O_2$ の濃度，$K_c$ と $K_o$ はそれぞれ $CO_2$ と $O_2$ に対するミカエリス定数である．式4において，酸素が競合的にカルボキシル化反応を阻害するさまは，分母の $O$ に表されている．酸素濃度が高くなると，分母が大きくなり，カルボキシル化速度が低くなる．式4，5を式3に代入すると以下の解を得る．

$$W_c = \frac{V_{c\max}(C - \Gamma^*)}{C + K_c(1 + O/K_o)} - R_d \qquad (6)$$

ここで，$\Gamma^* = (V_{o\max}\,K_c O)/(2\,V_{c\max}\,K_o)$ である．また，$\Gamma^* = (C\;V_o)/(2\;V_c)$ でもあり，これは，ミトコンドリア呼吸を無視したときの $CO_2$ 補償点と等しい．

直観的に光合成の $CO_2$ 応答を説明すると，$CO_2$ 濃度上昇は，分子の $C$ の増加によって光合成速度を増加させる．光呼吸による $CO_2$ 放出の影響は分子の $-\Gamma^*$ の項に含まれている．$V_{c\max}$ は葉によって異なり，Rubisco量

（活性）が高いほど高い．

・RuBP が不足している場合

Farquhar らのモデルでは，RuBP 再生速度は電子伝達速度に律速されていると仮定している．カルビンサイクルで 1 モルの RuBP を再生するためには 2 モルの NADPH が必要であり，このためには 4 モルの電子が伝達される必要がある．さらに，酸素化反応が 1 度起こると，光呼吸では 4 つの電子を消費する．電子伝達速度を $J$ とすると，$J=4V_c+4V_o$ である．これに Γ＊を導入して式 3 に代入すると，電子伝達速度と光合成速度 $W_j$ の関係は以下のようになる．

$$W_j=\frac{J(C-\Gamma^*)}{4C+8\Gamma^*}-R_d \qquad (7)$$

電子伝達速度 $J$ は，光強度 $I$ に対し飽和曲線を示す．様々な曲線が利用されているが，ここでは非直角双曲線を紹介する．

$$J=\frac{\phi_r I+J_{\max}-\sqrt{(\phi_r I+J_{\max})^2-4\phi_r I\theta_r J_{\max}}}{2\theta_r} \qquad (8)$$

ここで $\phi_r$ は曲線の初期勾配，$J_{\max}$ は光飽和時の最大電子伝達速度，$\theta_r$ は曲線の凸度を示す．$J_{\max}$ は葉によって異なり，電子伝達系タンパク質の量が多いほど高い．つまり，高 $CO_2$ 濃度域における光合成速度を高くするためには，電子伝達系タンパク質などの量を増やせばよい．

光合成速度 $A$ は $W_c$ と $W_j$ のうち低いほうとして求められる．

$$A=\min\{W_j,\ W_c\} \qquad (9)$$

この式 9 を $CO_2$-光合成曲線にフィットさせたのが図 2 a である．

## 1.a.4　パラメータの温度依存性

$K_c$ や $V_{cmax}$ など酵素反応にかかわるパラメータの多くは温度によって値が変わる．その変化は多くの場合指数関数的で，よく用いられるのはいわゆるアレニウス式である．

$$f(T_k)=f(25)\exp\left[\frac{E_a(T_k-298)}{298RT_k}\right] \qquad (10)$$

ここで $f$ は任意のパラメータ，$f(25)$ は 25℃のときの $f$ の値，$T_k$ は絶対温度，$R$ は気体定数（8.314 $J\ mol^{-1}\ K^{-1}$）である．$E_a$ は活性化エネルギーで，曲線の傾きを意味する．高温でパラメータの値が低下する場合にはピークモデルが使われる．三次式など様々な式が利用されているが，以下はその一種である．

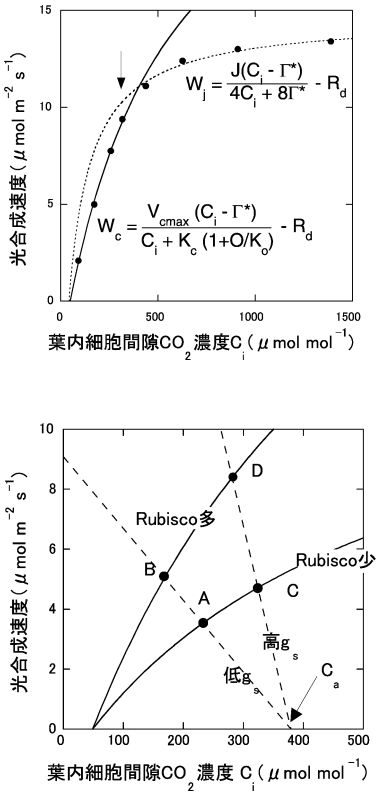



**図 2**：$CO_2$-光合成曲線[9]．葉内細胞間隙 $CO_2$ 濃度（$C_i$）に対し光合成速度をプロットしている．上）ミズナラの例を示す．測定条件は光強度 1000 μ mol $m^{-2}s^{-1}$，葉温 20°C．矢印は大気 $CO_2$ 濃度（370 μ mol $mol^{-1}$）のときの測定値．近似曲線については本文を参照．下）Rucisco 量と気孔コンダクタンス（$g_s$）が光合成速度に与える影響．実線は光合成速度の $CO_2$ 濃度依存性を示す．Rubisco 量が多い葉は同じ $C_i$ で比べると高い光合成速度を持つ．点線は，大気 $CO_2$ 濃度（$C_a$）と同じ値のときに光合成がゼロになる点から，傾き＝－気孔コンダクタンスの直線を引いたもの（本文参照）．点線と実線が交わる点が葉の光合成速度となる．低い光合成速度を持つ葉（A）が光合成速度を上げようとする場合，rubisco 量を増やすだけでも（B）気孔コンダクタンスを上げるだけでも（C）光合成速度が上がる．Rubisco 量・気孔コンダクタンスの両方を高くするとより高い光合成速度が得られる（D）．

$$g(T_k)=\frac{g(25)\exp\left[\frac{H_a(T_k-298)}{298R(T_k+25)}\right]\left(1+\exp\left[\frac{298\Delta S-H_d}{298R}\right]\right)}{1+\exp\left[\frac{\Delta ST_k-H_d}{T_kR}\right]} \qquad (11)$$

$H_a$ は活性化エネルギー，$H_d$ は不活性化エネルギー，$\Delta S$ はエントロピーを示す．光合成速度の温度依存性は一般に上に凸の放物線の形になるが，様々なパラメータの温度依存性の影響を受けるため非常に複雑なものとなる．詳しくは von Caemmerer[2] や Hikosaka et al.[3] を参照．

## 1.a.5 $CO_2$ の拡散

光合成において，$CO_2$ は葉の外部からの拡散によって供給される．拡散における二点間の物質の移動速度は Fick の第一法則にしたがう．光合成にあてはめると，

$$A = g(C_2 - C_1) \quad (12)$$

ここで $A$ は光合成速度（＝$CO_2$ の移動速度），$g$ はコンダクタンス（抵抗の逆数），$C_1$ と $C_2$ は二点それぞれの $CO_2$ 濃度に相当する．

葉の光合成においては，$CO_2$ は葉の外から，葉の周囲に生じる境界層，気孔，葉内細胞間隙を経て葉肉細胞の細胞壁に含まれる水に溶け込む．そして細胞壁から細胞膜，細胞質，葉緑体包膜を通過してストロマに達し，カルビンサイクルで同化される．拡散に対する影響は境界層，気孔，そして細胞壁からストロマまでの過程が大きいと考えられている．式で表すと以下のようになる．

$$A = g_b(C_a - C_b) = g_s(C_b - C_i) = g_m(C_i - C_c) \quad (13)$$

ここで $g_b$，$g_s$，$g_m$ はそれぞれ境界層コンダクタンス，気孔コンダクタンス，葉肉コンダクタンスであり，$C_a$，$C_b$，$C_i$，$C_c$ は葉の外，気孔入り口，葉内細胞間隙，葉緑体内の $CO_2$ 濃度である（$C_c$ は気体中の濃度に換算）．

境界層における抵抗は，風が吹くなど葉の周囲で空気が動いていればほとんど無視できる．逆に，風が全く止まってしまった場合では無視できない可能性がある．同化箱法で光合成速度を測定する際には，ファンで同化箱内の空気をかき回すことによって境界層コンダクタンスを上げる必要がある．境界層抵抗が無視できる場合は，式 13 は以下のように書くことができる．

$$A = g_s(C_a - C_i) \quad (14)$$

気孔コンダクタンス $g_s$ は気孔の開閉により大きく変化する．気孔が完全に閉じるとコンダクタンスも 0 に近くなる．

気孔コンダクタンスがどのように光合成速度に影響を与えるかを図 2 b を使って考えてみよう．式 14 は，$A$ が左辺に出ているため，光合成速度を規定している式と勘違いされることもあるが，実際は葉緑体への $CO_2$ の供給能力を表している（直観的には $C_i = C_a - A/g_s$ と変形したほうがわかりやすい）．図 2 b では横軸に $C_i$ を，縦軸に光合成速度を示している．図中実線は上述した光合成の生化学的モデルであり，光合成速度は $C_i$ に依存すると仮定する．図中点線は $A = g_s(C_a - C_i) = -g_s(C_i - C_a)$ である．つまり，横軸の切片が $C_a$ と同じ値（ここでは 370 $\mu$ mol mol$^{-1}$）で，そこから傾き $-g_s$ で上昇する直線である．実線と点線が交わった点が光合成速度となる．つまり，光合成速度は Farquhar モデルと式 14 の連立方程式の解として求められる．Farquhar と Sharkey[4] は，実線を要求関数（demand function），点線を供給関数（supply function）と呼んだ．Rubisco など光合成系タンパク質によって $CO_2$ をどれだけ要求するかが決まり，気孔コンダクタンスによってどれだけ $CO_2$ を供給できるかが決まるということである．この図から，葉が光合成速度を高めるためには二つの方法があることがわかる．一つは，光合成系タンパク質の量（活性）を増やす（＝要求関数の傾きを大きくする）ことである．もう一つは，気孔コンダクタンスを高くする（＝供給関数の傾きを大きくする）ことである．

## 1.a.6 各パラメータの推定原理

・光合成速度と気孔コンダクタンス

同化箱法によって光合成速度を測定する場合，同化箱内部の $CO_2$ 濃度が $C_a$ にあたり，同化箱に入る空気と同化箱から出て行く空気の $CO_2$ 濃度の差から光合成速度 $A$ を計算することができる（詳しくは同化箱法参照）．しかし $g_s$ と $C_i$ を知ることはできない．情報を補うために蒸散の測定を同時に行う．蒸散速度 $E$ は以下のように表される．

$$E = g_h(H_i - H_a) \quad (15)$$

ここで $g_h$ は水蒸気に対する気孔コンダクタンス，$H_i$ と $H_a$ は葉の内部と外部の水蒸気濃度である．$H_a$ と $E$ は同化箱に出入りする空気の水蒸気濃度を測定することによって得られる．さらに，葉内細胞間隙の水蒸気濃度はほぼ飽和しているため，葉温を測定することにより $H_i$ を推定できる．ここから $g_h$ を計算する．$g_s$ は $g_h$ と比例し，$g_h$ を 1.6 で割れば $g_s$ が求められる．そして $C_i$ が計算できる．

**・葉肉コンダクタンス**

気孔コンダクタンスで説明したように，$CO_2$ 濃度を調べるだけではコンダクタンスまで計算することはできない．また，気孔コンダクタンスは蒸散を測定することにより推定が可能であったが，葉肉細胞内は水で満たされているため蒸散に関する情報は葉肉コンダクタンスの推定には利用できない．葉肉コンダクタンスが測定できるようになったのは 1990 年代に入ってからである[5]．

現在葉肉コンダクタンスの推定法として 5 種類の方法

が知られている[6]．主として安定同位体を用いる方法とクロロフィル蛍光を用いる方法がよく使われ，前者は光合成研究のための安定同位体測定法の章で紹介する．ここではクロロフィル蛍光を用いる方法の原理を説明する．

クロロフィル蛍光を測定することにより，電子伝達速度を推定することができる（詳細はクロロフィル蛍光の項参照）．電子伝達速度 $J$ を推定する方法はいくつかあるが，仮定をおくことにより簡便に計算することができる．

$$J=0.84\times\Delta F/F_m'\times I\times 0.5 \qquad (16)$$

ここで 0.84 は葉の光吸収率(実際はクロロフィル含量や葉の反射率など光学的な要因によって変化する)，$\Delta F/F_m'$は光化学系 II の光化学反応の量子収率，$I$ は照射光強度，0.5 は総クロロフィル量に対する光化学系 II クロロフィルの割合である（これも常に 0.5 とは限らない）．$J$ と光合成速度 $A$ の関係は式 7 によって規定されるため，以下の式によって $C_c$ を計算することができる．

$$C_c=\frac{8(A+R_d)\Gamma^*-J\Gamma^*}{4(A+R_d)-J} \qquad (17)$$

原理的にはガス交換とクロロフィル蛍光を一度同時に測定すれば $C_c$ を計算することができることになるが，実際には $J$ の推定に様々な仮定を含んでいること，計算が複雑であるため誤差の影響が大きくなる可能性があることなどから，一度の測定で得られる値から計算した $C_c$ の確からしさは低いと考えられている．より確かな値を求めるために様々な工夫がなされている．詳しくは Harley et al.[7] を参照のこと．

### ・$CO_2$ 補償点

見かけ上の $CO_2$ 補償点，つまり $CO_2$ 吸収速度が 0 になる $CO_2$ 濃度は単純に $CO_2$－光合成曲線を見ることによって求まる．重要なのは Γ＊，つまりミトコンドリア呼吸を無視したときの $CO_2$ 補償点である．これを求める方法は二つある．

一つはガス交換法を用いるもので，100 $\mu$ mol mol$^{-1}$ 以下の低 $CO_2$ 濃度において，異なる光強度で $CO_2$－光合成曲線を描くことにより得られる[8]．低 $CO_2$ 濃度では光合成速度と $CO_2$ 濃度の関係はほとんど直線であるが，その傾きは光強度によって異なる（Rubisco が弱光下で不活性化するため）．その直線の交点が Γ＊に相当する（図 3）．

もう一つは抽出あるいは単離したルビスコの specificity factor を測定する方法である．specificity

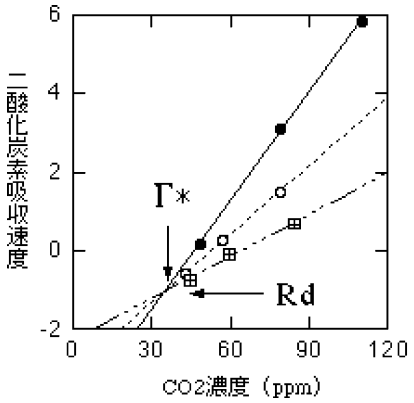



**図 3**：$CO_2$ 補償点 Γ＊の測定例．異なる光強度で，低 $CO_2$ 濃度における $CO_2$-光合成曲線を描く．それぞれの光強度のデータを回帰し，回帰直線が交わったところが Γ＊となる．

factor($\tau$)は $\tau=(K_o V_c)/(K_c V_o)=(K_o V_{c\max})/(K_c V_{o\max})$ と定義され，$\tau=0.5\,O/\Gamma^*$ という関係にある．測定法は酵素・電子伝達成分の精製・活性測定・定量を参照．

### ・光呼吸

通常大気条件で光呼吸速度を直接測定する方法はない．$CO_2$ 濃度を 0 にしたときの $CO_2$ 放出速度は光呼吸速度＋暗呼吸速度であるが，このときの光呼吸速度は通常大気条件での光呼吸速度とは異なる．また，酸素濃度 2％のときの $CO_2$ 吸収速度から酸素濃度 20％のときの $CO_2$ 吸収速度を差し引くことにより光呼吸速度を推定されたことがあるが，これも大気条件での光呼吸速度とは異なる．現在のところ光呼吸速度を推定するには Farquhar モデルを用いて $V_o$ を計算するしかない．

## 参考文献


1）G. D. Farquhar, S. von Caemmerer & J. A. Berry, Planta **149** (1980) P78.
2）S. von Caemmerer, Biochemical models of leaf photosynthesis. CSIRO Publishing, Collingwood (2000)
3）K. Hikosaka, K. Ishikawa, A. Borjigidai, O. Muller & Y. Onoda, J. Exp. Bot. **57** (2006) 291.
4）G. D. Farquhar & T. D. Sharkey, Ann. Rev. Plant Physiol. **33** (1982) P317
5）S. von Caemmerer & J. R. Evans,. Aust. J. Plant Physiol. **18** (1991) P287.
6）C. R. Warren, Funct. Plant Biol. **33** (2006) P431.
7）P. C. Harley, F. Loreto, G. Di Marco & T. D. Sharkey, Plant Physiol. **98** (1992) P1429.
8）A. Brooks & G. D. Farquhar, Plant Physiol. **74** (1985) P759.
9）彦坂幸毅「植物生態学」，朝倉書店，2004，P42

# 1．個葉から葉緑体スケールのガス交換
## b. 光合成研究のための安定同位体測定法

半場　祐子[1)]

安定同位体は，光合成の環境応答を調べる上で細胞レベルから生態系レベルまで広範囲に利用できるツールである．安定同位体とは何かを解説し，その測定方法と光合成研究への利用法を解説する．

## Measurement of the plant stable isotopes.

Yuko T. Hanba

Stable isotopes have been widely used in biochemistry, physiology and ecology as an useful index for plant environmental responses. Principles of the isotope fractionation and its application to photosynthesis research will be discussed.

### 1.b.1　安定同位体とは

#### 1.b.1.1　安定同位体について

植物の光合成研究を研究対象の空間的なスケールで分類すると，大きな方から生態系，群落，個体，組織，細胞，オルガネラとなるであろう(表1)．研究手法は分子・生化学的手法，生理的手法，微気象的方法やリモートセンシングなどが用いられているが，安定同位体は他の方法と比べると，細胞レベルから生態系レベルまで広範囲に利用できること，また積算的な情報が得られ比較的分析コストが安価であるという特色がある．

同位体とは，ある特定の元素に属し，核の中性子数が異なるため質量が異なっている原子のことをいう．同位体は，時間の経過とともにエネルギーを放射して別の元素に壊変する放射性同位体と，時間が経過しても不変である安定同位体 stable isotope とに分けられる[1),2)]（表2）．放射性同位体の安定性は半減期 (half-life) であらわされる．一方，安定同位体の量は存在比 abundance であらわされる．ある特定の元素の中では1つの安定同位体の存在比がきわめて高く，例えば $^{12}C$ は全ての C の98.9%を占める．

安定同位体比は標準物質に対する偏差であらわされる．この偏差は非常に小さいので1000分偏差（パーミル：‰）であらわされる．ある物質 $X$ について，2種の安定同位体の比率を R とすると，安定同位体比は次の式で計算される．

$$\delta X = \{R_{サンプル} / R_{標準物質} - 1\} \times 1000(‰) \qquad (1)$$

植物に関係する主な軽元素について，安定同位体比の表記法と測定精度を表3に示す．

#### 1.b.1.2　安定同位体比の測定法：質量分析計

安定同位体比は，安定同位体専用の質量分析計（isotope mass spectrometer；略して MASS と称す）を使って測定する．国内でよく使われている測定装置には，サーモフィッシャー社が扱っているシリーズ（Finnigan MAT252，Delta Plus など）がある．

質量分析計の大まかな原理を解説する．質量分析計は通常，分子量64以下の軽元素の安定同位体比を測定する．サンプル中に含まれる元素の安定同位体比を質量分析計で測定するためには，あらかじめそれぞれの元素が気体になっている必要がある(表3)．測定にあたっては，サンプルと標準物質の安定同位体比測定を交互に行う(図1)．サンプルの単独測定を行わない理由は，測定に長時間かかるためその間に装置のドリフトが生じ，測定精度を悪化させるためである．短時間の交互測定を4回～10回繰り返し，標準物質からの偏差の平均値を算出する．サンプルと標準物質はそれぞれ別々の導入口（インレット inlet）から導入され，チェンジオーバーバルブにより交互に分析管に送られる．気体分子の平均自由行程を長くするために，質量分析計の内部は $10^{-5}$Pa 以下の高真空に保たれている．導入された気体はイオンソースを通ってイオン化され，加速電圧をかけられて高速で磁場に進入する．磁場ではイオン化された気体は進路が曲がるが，質量に応じて曲率が異なるため，ここで分子量の異なる分子を分離することができる．ファラデーカップと呼ばれる装置でイオン化された分子を受け取る．

1）京都工芸繊維大学　生物資源フィールド科学教育研究センター

**表 1**：植物の光合成研究に使われる手法とその特色

| 方法 | 測定スケール | 利点 | 欠点 |
|---|---|---|---|
| 安定同位体 | 細胞から生態系まで | 積算的な情報が得られる，分析が容易でランニングコストが安い | 影響因子の特定が難しい場合がある<br>測定装置は高価 |
| 生化学的方法 | 細胞，葉の切片，植物抽出物（タンパク質など） | 詳細な分析が可能で反応機構の研究に適している | 生体外測定のため生体内での再現性が不明確 |
| 生理学的方法（ガス交換法） | 葉，シュート | 生きた植物で測定できる，測定が比較的簡便 | 測定時の環境条件に大きく影響される，瞬間的な情報しか得られない |
| 生態学・微気象的方法，リモートセンシング | 群落，生態系 | 大規模スケールで推定可能 | 時間とコストがかかる，植物反応との関連づけが難しい |

**表 2**：植物の研究に利用される主な同位体の種類と存在比および半減期[1)2)]

| 元素 | 安定同位体 | 存在比(%) | 放射性同位体 | 半減期 |
|---|---|---|---|---|
| 水素 | $^{1}H$<br>$^{2}H$ | 99.985<br>0.015 | $^{3}H$ | 12.32 y |
| 炭素 | $^{12}C$<br>$^{13}C$ | 98.89<br>1.11 | $^{10}C$<br>$^{11}C$<br>$^{14}C$<br>$^{15}C$ | 19.3 s<br>20.3 m<br>5715 y<br>2.45 s |
| 酸素 | $^{16}O$<br>$^{17}O$<br>$^{18}O$ | 99.76<br>0.04<br>0.20 | $^{14}O$<br>$^{15}O$ | 70.6 s<br>122.2 s |
| 窒素 | $^{14}N$<br>$^{15}N$ | 99.63<br>0.37 | $^{12}N$<br>$^{13}N$ | 0.1 s<br>10 m |
| 硫黄 | $^{32}S$<br>$^{33}S$<br>$^{34}S$<br>$^{36}S$ | 95.0<br>0.76<br>4.22<br>0.014 | $^{35}S$ | 87.51 d |

**表 3**：安定同位体比とその表記法

| 元素 | 安定同位体の比率 $R$ | 表記 | 測定気体 | 測定精度[2)] (‰) |
|---|---|---|---|---|
| H | $^{2}H/^{1}H$(D/H) | $\delta D$ | $H_2$ | 0.2* |
| C | $^{13}C/^{12}C$ | $\delta^{13}C$ | $CO_2$ | 0.01** |
| O | $^{18}O/^{16}O$ | $\delta^{18}O$ | $CO_2$ | 0.01** |
| N | $^{15}N/^{14}N$ | $\delta^{15}N$ | $N_2$ | 0.02* |
| S | $^{34}S/^{32}S$ | $\delta^{34}S$ | $SO_2$ | 0.5*** |

*200 μL，**100 μL，***50 μg，サーモエレクトロンサイエンティフィック㈱の技術資料より引用

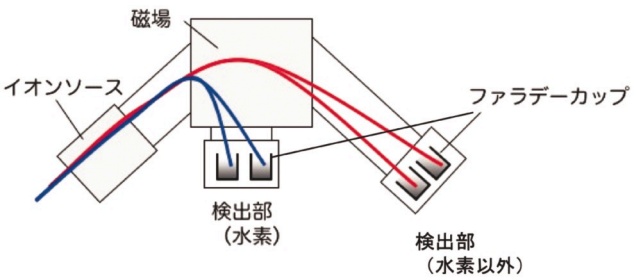



**図 1**：安定同位体比測定用の質量分析計における基本的な構造と測定原理．導入口から導入された測定気体は質量によって分離され最終的にファラデーカップで検出される．

### 1.b.1.3　標準物質

安定同位体の測定にあたっては，国際標準物質 international standard が定められている(表 4)．国際標準物質は希少であることが多く，実際の測定には国際標準物質に対する安定同位体比が既知であるワーキングスタンダードをそれぞれの研究機関で定め，これをスタンダードとして用いる．例えば窒素や炭素のワーキングスタンダードとしてはガスボンベの $N_2$ や $CO_2$ が用いられる．

### 1.b.1.4　サンプルの前処理

#### 1.b.1.4.1　植物の有機物に含まれる窒素・炭素

植物の有機物に含まれる窒素や炭素の安定同位体比分析には，サンプルのガス化と安定同位体比測定を同時に行うことができる，燃焼システムと質量分析計が接続された自動分析装置が広く用いられている（図 2)．

測定の前処理は，サンプルを穏やかに熱乾燥させて(60～80°C)，有機物が混入しないようにしながら 40 メッシュ程度に細かく粉砕する．有機物質の同位体組成はいったん乾燥させればほとんど変化しないため，分解が起こらない状態で保存されているサンプルの炭素同位体組成は長期間一定であり，標本等で分析を行なうことが可能である．1 回の分析に必要なサンプルの量は測定装置や条件によって異なるが，図 2 のシステムで植物の炭素を分析する場合は 2 mg 程度，植物の窒素を分析する

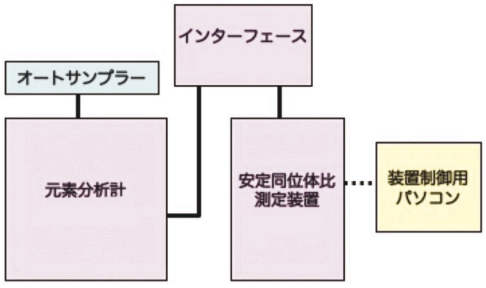



**図 2**：有機物の炭素および窒素の安定同位体比を自動的に分析するための測定装置．燃焼部分（元素分析計）がインターフェースを介して質量分析計に接続されている．

**表 4**：それぞれの安定同位体に対する国際標準物質一覧[1)2)]

| 安定同位体 | 標準物質 | 略称 | 安定同位体比 |
|---|---|---|---|
| $^{2}H/^{1}H$ (D/H) | ウイーン標準海洋水<br>Standard Light Antarctic Precipitation | VSMOW,<br>SLAP | 0.00015576<br>0.000089089 |
| $^{13}C/^{12}C$ | Pee Dee ベレムナイト* | PDB | 0.0112372 |
| $^{18}O/^{16}O$ | ウイーン標準海洋水<br>Pee Dee ベレムナイト<br>Standard Light Antarctic Precipitation | | 0.0020052<br>0.0020672<br>0.0018939 |
| $^{15}N/^{14}N$ | 大気 | | 0.003676 |
| $^{34}S/^{32}S$ | Diablo 峡谷隕石** | CD | 0.045005 |

*アメリカ・ノースキャロライナ州の Pee Dee 層に産出する矢石（イカの仲間の化石）の炭酸カルシウム
**アメリカ・アリゾナ州の Diablo 峡谷にあるクレーターで産出する隕石の成分（トリオライト）

場合は 10 mg 程度である．計量してスズ箔に包み，オートサンプラーにセットする（図 2）．1 日に 100 サンプル以上分析が可能である．

測定装置の精度はさまざまな理由により変動することがある．測定を行うたびに精度を確認し，適宜測定値の補正を行う必要がある．例えばワーキングスタンダードとして使用しているアラニンやチロシンを 10 サンプルあたり 1 回程度分析することにより，チェックを行う．

#### 1.b.1.4.2　真空ラインを利用した大気中 $CO_2$ の分取

大気中の $CO_2$ の炭素安定同位体比を測定するためには $CO_2$ を精製する必要がある．このためにはパイレックスガラス製，あるいはステンレス製の真空ラインを使用する（図 3）．真空ラインは高性能のポンプを使って強力に空気を引きながら，低温寒剤を使ってガスを精製する装置である．通常は特注品となる（光信理化学製作所・東京など）．液体窒素（−170°C）とドライアイスエタノール（−70°C）のトラップを作る（デュワー瓶などの保冷容器に低温寒剤を入れる）．これらのトラップを使用して大気ガスから窒素や水蒸気を取り除き，$CO_2$ を精製してガラス管に収集・封入する．大気ガスには，$CO_2$ と質量数が同等である $N_2O$ が含まれており，精製の過程で取り除くことができない．0.1 g 程度の還元銅をガラス管の中に入れておき，封入が終わったら 400°Cのマッフル炉で 3 時間焼く．この過程で $N_2O$ が $N_2$ に還元される．真空ラインと質量分析計を直結し，精製過程を省いて $CO_2$ の炭素安定同位体比分析が行えるようなシステムも稼動している．

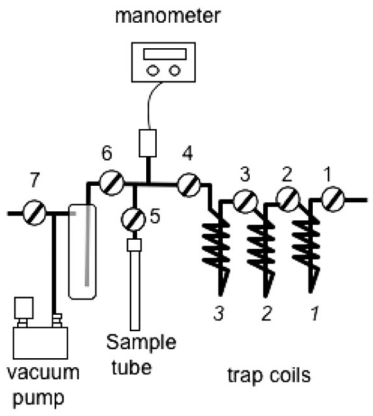



**図 3**：大気ガスから $CO_2$ を精製するための真空ラインの概略図．真空ポンプを使ってラインの中を引き，真空計で真空度を確認しながら精製作業を行なう．気体はライン右側から送り込む．

#### 1.b.1.4.3　植物の酸素・水素の安定同位体比

化学変化が生じないように保存されたサンプルのセルロースを抽出し，ニトロ化してニトロセルロースとする．このニトロセルロースを燃焼させ，酸素の安定同位体を分析する場合は二酸化炭素を，水素の安定同位体を分析する場合は水を収集して安定同位体比を測定する[2)]．2000 年ごろに開発された熱分解元素分析計（TCEA-IRMS，サーモフィッシャーサイエンティフィック）を質量分析計に接続して使用することにより，有機物の酸素と水素の同位体比を自動で同時測定することが可能となった．

#### 1.b.1.4.4　植物の水の酸素・水素の安定同位体比

植物は採取後，すぐにガラス管に密閉する．真空蒸留によって水を抽出し，酸素の安定同位体を分析する場合は二酸化炭素と交換平衡させて二酸化炭素を収集しその安定同位体比を分析する．水素の安定同位体を分析する場合は亜鉛を触媒として水を水素に還元し，収集してその安定同位体比を分析する[2)]．

### 1.b.2　炭素安定同位体比

#### 1.b.2.1　炭素安定同位体比 $\delta^{13}C$ と光合成

炭素の安定同位体 $^{12}C$ と $^{13}C$ は，大気中や水中を拡散する速度や化学反応の反応性が異なる．軽い同位体 $^{12}C$

の方が拡散する速度は速く，一般的には化学反応に対する反応性も高い．植物の光合成は様々な物理化学反応プロセスを経ているため，光合成の基質である大気 $CO_2$ と比較すると植物の炭素化合物の炭素は $^{13}C$ が相対的に少ない．このように $^{13}C$ がどの程度分別されたかを同位体分別（discrimination）という．光合成の初期過程での同位体分別は特に記号 Δ（ギリシャ文字の大文字のデルタ）で表し，次の式で表される．

$$\Delta = \delta_a/\delta_p - 1 \qquad (2)$$

$\delta_a$，$\delta_p$はそれぞれ標準物質 PDB に対する，大気中の $CO_2$ および植物の $\delta^{13}C$ である．

### 1.b.2.2.1　大気中の $CO_2$ の炭素安定同位体比

光合成の基質である大気中 $CO_2$ の $\delta^{13}C$ は植物の $\delta^{13}C$ の決定要因のひとつとなる（式 2）．自動車の排気ガスのように化石燃料起源の $CO_2$ は，上空の大気に比べると $^{13}C$ が少なくなることが知られている[3]．つまり，都市部や工業地帯の大気中の $CO_2$ は，山間部や砂漠のような人間の活動の影響が少ないところとは $\delta^{13}C$ が異なる（表 5）．

また，森林の大気の $CO_2$ には土壌呼吸や植物の呼吸によって放出される $CO_2$ が混合している．呼吸によって放出される $CO_2$ には $^{13}C$ が少なくなっている．そのため，呼吸 $CO_2$ が滞留しやすい条件，例えば地表付近，樹木の密度が高い森林（熱帯林など），夜間は，森林の大気の $CO_2$ にはさらに $^{13}C$ が少なくなる[4]（表 5）．

### 1.b.2.2.2　光合成による同位体分別

光合成は植物の $\delta^{13}C$ に最も大きな影響を与える要因である．光合成によって $CO_2$ が固定されるときにはたらく酵素は植物が利用している光合成経路によって異なり，$C_3$ 植物では主に Rubisco，$C_4$ 植物と CAM 植物では主に PEP カルボキシラーゼと Rubisco である．Rubisco と PEP カルボキシラーゼとは同位体分別が大きく異なる（表 6）．大きな同位体分別を示す酵素 Rubisco が主にはたらく $C_3$ 植物は，$C_4$ 植物や CAM 植物と比べて $^{13}C$ が少ない．イネ科の植物については，$C_3$ 植物の炭素の $\delta^{13}C$ は平均値で－28 ‰であるが，$C_4$ 植物では－14 ‰である[5]．CAM 植物の値は－10～－20 ‰であり，昼間と夜間に固定される $CO_2$ の比率などによって同一植物においても変動がみられることがある[5]（図 4）．

$C_3$ 植物では，同位体分別 Δ は細胞間隙の $CO_2$ 分圧と強い相関がある．葉内で $CO_2$ 分圧の低下がないと仮定した場合，Δ は次のようにあらわされる[6]．

$$\Delta = a[(C_a - C_i)/C_a] + bC_i/C_a \qquad (3)$$

$C_a$ と $C_i$ は，それぞれ大気と葉内（細胞間隙）の $CO_2$ 分圧をあらわしている．$a$ は，$CO_2$ が気孔から取り込まれる際に，$^{12}CO_2$ と $^{13}CO_2$ の拡散速度の違いによって生じる分別（4.4 ‰）である．$b$ は，$CO_2$ 固定酵素によって $CO_2$ が同化されるときの分別で，27 ‰－30 ‰と考えられている．この式から，$C_3$ 植物の同位体分別は，酵素反応によってほとんど決まることが分かる．

$CO_2$ 分圧と同位体分別との関係は，次のように説明することができる．Rubisco は $^{12}CO_2$ の方とよく反応するため，Rubisco の近くの空気（細胞間隙）では $^{13}CO_2$ よりも $^{12}CO_2$ が多く消費され，その結果相対的に $^{13}CO_2$ が増える．気孔が閉じてくると細胞間隙での $^{13}CO_2$ の濃度が高くなっていくため，Rubisco は $^{13}CO_2$ とも反応するようになってくる．一方，気孔が十分に開いていれば，細胞間隙と大気の $CO_2$ は十分に混合されるので，細胞間隙での $^{13}CO_2$ 濃度は大気よりもそれほど高くならない．このときには Rubisco が $^{13}CO_2$ と反応する割合は相対的に低くなる．このようなことから，大気中の $CO_2$ 分圧 $C_a$ が一定である場合には，$C_3$ 植物の同位体分別は $C_i$ が小さいほど小さくなる（相対的に軽い同位体が少なくなる）ことになる[7]．

なお，$C_4$ 植物では，$CO_2$ はまず PEP カルボキシラーゼによって葉肉細胞で固定された後，維管束鞘細胞で

**表 5**：さまざまな測定場所における大気 $CO_2$ の炭素安定同位体比

| 測定場所 | 炭素安定同位体比（‰） |
|---|---|
| 上層大気 | －8 |
| 都市部の大気* | －11.6 |
| 山間部の大気** | －10　京都市美山町国道<br>－12　タイ・ナラチワ熱帯林<br>－9　夏の北海道落葉広葉樹林 |
| $CO_2$ ボンベ | －24 ～ －38 |

*京都市五条通での計測（未発表）
**Hanba et al.（1997）

**表 6**：光合成に関連する炭素安定同位体分別[35]

| 過程 | 分別（‰） |
|---|---|
| $CO_2$ の水への溶解 | 1.1 |
| $CO_2$ の水和 | －9.0 |
| 大気中での $CO_2$ 拡散 | 4.4 |
| 水中での $CO_2$ 拡散 | 0.7 |
| カーボニックアンヒドラーゼ触媒による $CO_2$ の水和 | 1.1 |
| PEP カルボキシラーゼによるカルボキシル化 | 2.0 |
| Rubisco | 29.0 |

Rubisco によって再固定される．$C_4$ 植物については同位体分別のモデルはいまだに不完全な部分があるが，葉内で $CO_2$ の低下がないと仮定した場合，次のように表されている[8]．

$$\Delta = a + (b_4 + \phi(b_3 - s) - a)C_i/C_a \qquad (4)$$

$a$ は，$CO_2$ が気孔から取り込まれる際に，$^{12}CO_2$ と $^{13}CO_2$ の拡散速度の違いによって生じる分別（4.4‰）である．$b_4$ は，$CO_2$ 固定酵素 PEP カルボキシラーゼによってガス体の $CO_2$ が同化されるときの分別で，−5.7‰と考えられている．$b_3$ は，$CO_2$ 固定酵素 Pubisco の分別である（30‰）．$\phi$ は維管束鞘細胞からの漏れであり，$s$ は漏れに伴う分別である．$C_4$ 植物でも細胞間隙の $CO_2$ 分圧の変化に対して同位体比が変化することは分かっている．ただしその変動幅は $C_3$ 植物よりもずっと小さい[9]．また，維管束鞘細胞で固定される $CO_2$ の比率が高いほど同位体比は低くなる（より $C_3$ 植物に近い値になる）が[8]，維管束鞘からの漏れは光や生育温度などの環境要因により変動し，$C_4$ 植物の Δ に影響を与える[10][11]．

### 1.b.2.3　炭素安定同位体比 $\delta^{13}$C の光合成研究への利用

#### 1.b.2.3.1　光合成回路の推定

$C_3$ 植物と $C_4$ 植物は，$\delta^{13}$C が異なる（図 4）．このことを利用すると，植物の $\delta^{13}$C から光合成回路を推定することができる[12]．現在のところ $C_4$ 植物が含まれることが明らかになっている科を表 7[13] に示す．$C_4$ 植物を含む最大の科であるイネ科の *Alleteropsis* 属，*Neurachne* 属，*Panicum* 属の中には $C_3$−$C_4$ 中間型の性質をもつ種があるため，$\delta^{13}$C からでのみ光合成型を決めることはできない[14]．また，CAM 植物と $C_3$ あるいは $C_4$ 植物も，炭素の $\delta^{13}$C によって区別することはできない（図 4）．

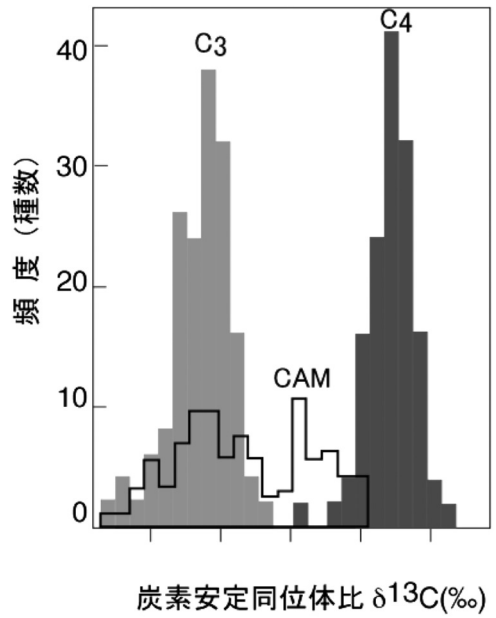



**図 4**：陸上高等植物における炭素安定同位体比の分布[7]．

#### 1.b.2.3.2　水利用

炭素の $\delta^{13}$C は，植物の水利用に関する指標として，欧米の研究者を中心に現在もグローバルスケールの研究などに広く利用されている[15][16]．ただし，後述するように $\delta^{13}$C には葉内における $CO_2$ 分圧低下の影響が大きいことが明らかになってきており[17]，$\delta^{13}$C と水利用効率の関係は再考が必要であるともいわれている[18]．ここではまず，従来使われて来た簡単なモデルについて説明する．水利用効率（water use efficiency, WUE）は気孔コンダクタンス（$g_s$）あるいは蒸散（$E$）と光合成速度（$A$）の比で表される値で，葉から失われた水に対してどの程度炭素を固定できたかを表している．水利用効率は，植物に乾燥ストレスがかかっているほど高くなる．水利用効率 WUE は，植物葉内の $CO_2$ 分圧（$C_i$）と植物体周辺の $CO_2$ 分圧（$C_a$）及び葉−大気間の水蒸気圧差（VPD）と次のような関係にある[2]．

$$\mathrm{WUE} = A/E = C_a(1 - C_i/C_a)/(1.6\mathrm{VPD}) \qquad (5)$$

$\delta^{13}$C も，水利用効率と同じように $C_i/C_a$ と直線的な相関があるため，炭素の $\delta^{13}$C から水利用効率を推定する

**表 7**：$C_4$ 型光合成をもつ科[14]

| | 科 | $C_4$ 種数 |
|---|---|---|
| 双子葉植物 | | |
| | Cappararidaceae | ＞2 |
| | アカザ | 550 |
| | オシロイバナ | ＞5 |
| | キク | 150 |
| | キツネノマゴ | 80 |
| | ゴマノハグサ | 14 |
| | ザクロソウ | ＞4 |
| | スベリヒユ | 70 |
| | タデ | 80 |
| | トウダイグサ | 250 |
| | ナデシコ | 50 |
| | ハマビシ | ～50 |
| | ハマミズキ | ～30 |
| | ヒユ | ～250 |
| | ムラサキ | ＞6 |
| 単子葉植物 | | |
| | トチカガミ | ＞1 |
| | カヤツリグサ | 1330 |
| | イネ | 4600 |

ことができる．$\delta^{13}C$ がよりプラスの値であるほど水利用効率は大きい．水利用効率が大きいことは，より乾燥ストレスがかかっていると解釈されることが多い．

$\delta^{13}C$ を水利用効率の指標として使うメリットとしては，生育期間の積算的な水利用効率を反映していること，乾燥した植物標本でも測定できること，多数のサンプルを短時間で測定できること等が挙げられる．森林の管理が林の水利用に与える影響などを調べることもでき[19]大変応用範囲が広いが，植物体全体の $\delta^{13}C$ にはさまざまな環境要因が影響を与えるため，特に野外の植物で解析を行なった場合には $\delta^{13}C$ の解釈には十分な注意が必要である（表1参照）．植物の $\delta^{13}C$ は，土壌水分や気象因子，植物の生長計測や生理的な計測などと組み合わせて解析を行なうべきである．また，常緑樹と落葉樹など，明らかに葉の内部形態が異なる種は，葉内における $CO_2$ 分圧低下の $\delta^{13}C$ への影響が異なるため，$\delta^{13}C$ によって水利用効率を比較するのは避けた方がよい[17]．

### 1.b.2.3.3　葉内 $CO_2$ 拡散コンダクタンスの推定

$C_3$ 植物で $CO_2$ 固定が行われる場所は，葉肉細胞中にある葉緑体内のストロマである．葉の $CO_2$ 分圧は，$CO_2$ が気孔から葉内の細胞間隙さらに葉肉細胞の葉緑体ストロマへと拡散するにつれて低下していく．光合成に伴う炭素安定同位体比の変化は，厳密にいえば葉緑体のストロマの $CO_2$ 分圧を反映している．炭素安定同位体比の測定と光合成の測定とを組み合わせることにより，葉緑体のストロマの $CO_2$ 分圧を推定できる，すなわち葉内での $CO_2$ 拡散コンダクタンス（内部コンダクタンス）を推定することができる．

これまでの研究により，気孔コンダクタンス，すなわち気孔の開閉が光合成の重要な制限要因であることは明らかになっていた．1990年代以降の研究により，内部コンダクタンスも気孔コンダクタンスと同程度，あるいはそれ以上に光合成速度の重要な制限要因になっていることが分かってきた[19]．気孔コンダクタンスに対する内部コンダクタンスの比率は地中海の草本あるいは木本種において1.4であるが[20]，果樹については0.6-0.9であり[21)22)]，温帯の樹木ではわずか0.5-0.6である[23]．内部コンダクタンスによる光合成の制限比率は20－35%であり，落葉樹であるカエデの方が草本であるヒマワリよりも大きくなっていた[24]．

葉の内部 $CO_2$ コンダクタンスを測定する方法は，3種類に大別される；(1)炭素安定同位体法[25] (2)クロロフィル蛍光法[26] (3)$A/C_i$ 曲線法[27]．このうち，炭素安定同位体法は経済コストと時間はかかるものの最も精度が高いとされている．ここでは炭素安定同位体法について説明する．

葉の内部 $CO_2$ コンダクタンスを測定するための測定装置を図5に示す．装置の右側部分は光合成ガス交換測定装置であり，ポットに植えたままの葉をチャンバにはさんで $CO_2$ 吸収量と $H_2O$ 蒸散量などを測定する．装置の左側部分はパイレックスガラス製の真空ラインであり，ポンプを利用してチャンバの空気を送り，液体窒素やドライアイスを用いて水蒸気や窒素ガスを取り除き $CO_2$ ガスの精製を行う．精製した $CO_2$ ガスについて，安定同位体用の質量分析計を用いて炭素安定同位体比の測定を行う（1.4.2章参照）．

植物の光合成によってチャンバの空気中に含まれる $CO_2$ の炭素安定同位体比は変化するが，その変化の度合いは，内部 $CO_2$ コンダクタンスがまったくないと仮定した場合と比較するとわずかにずれが生じる．そのずれの大きさと光合成速度の測定値から，内部 $CO_2$ コンダクタンスを計算することができる．以下に，内部コンダクタンスの計算方法を説明する[25]．用いられる略号を表8に示す．

$C_3$ 植物における，同位体分別（discrimination：$\Delta$）は以下の式で表される．

$$\Delta = a_b\frac{P_a-P_s}{P_a}+a\frac{P_s-P_i}{P_a}+a_i\frac{P_i-P_c}{P_a}+b\frac{P_c}{P_a}+\frac{\frac{eR_d}{k}+f\Gamma^*}{P_a} \quad (6)$$

すなわち以下の5つのステップで光合成に伴う $CO_2$ の安定同位体の分別が起こる．

1）大気から葉の表層まで（境界層）での $CO_2$ 拡散
2）葉の表層から細胞間隙までの $CO_2$ 拡散
3）細胞間隙から葉緑体までの $CO_2$ 拡散
4）葉緑体内でのRubiscoおよびPEPカルボキシラーゼによる $CO_2$ 固定
5）暗呼吸および光呼吸

3）が，$CO_2$ の内部拡散コンダクタンスに関係する項である．細胞間隙から葉緑体までの $CO_2$ 分圧の低下がまったくない（つまり，$CO_2$ の内部コンダクタンスが無限大である）と仮定する（$P_c=P_i$）．さらに暗呼吸速度に伴う同位体分別と光呼吸による同位体分別が無視できると仮定する．その場合の仮想的な同位体分別は

$$\Delta_i = a_b\frac{P_a-P_s}{P_a}+a\frac{P_s-P_i}{P_a}+b'\frac{P_i}{P_a} \quad (7)$$

実際に生じる同位体分別と，仮想的な同位体分別との差は，次の式で表される．

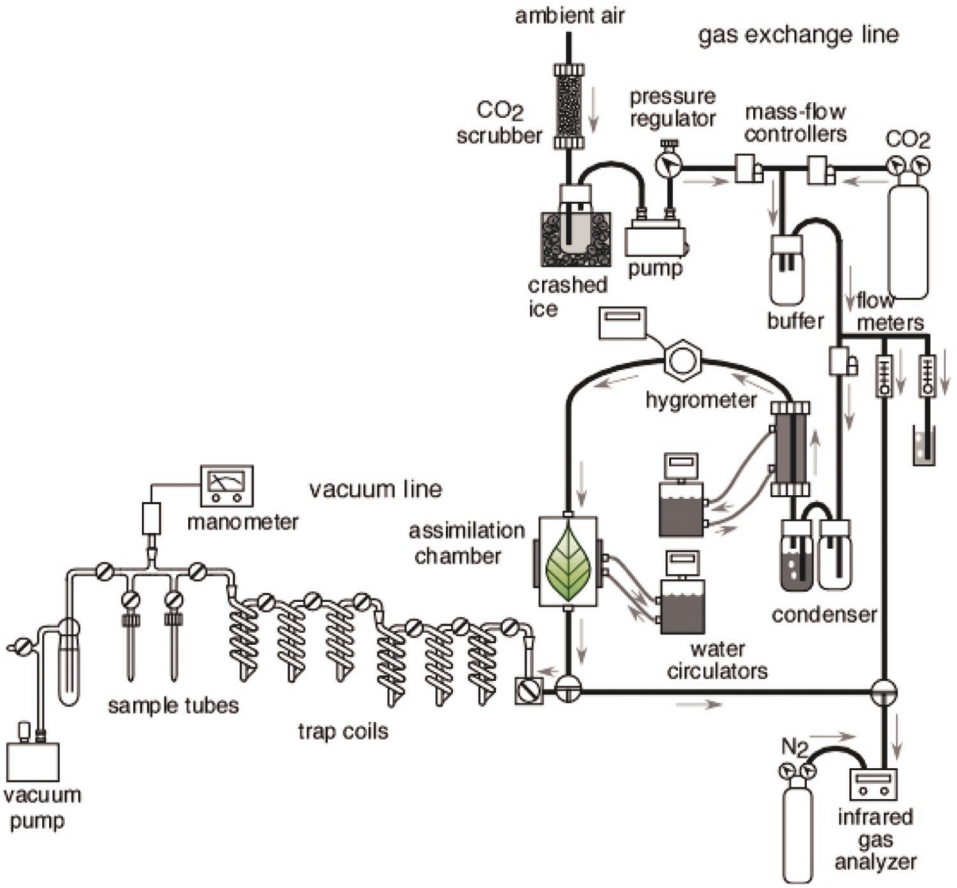



**図5**：葉内 $CO_2$ コンダクタンスを測定するための装置の概略．右側がガス交換測定装置，左側が真空ライン．

**表8**：葉内 $CO_2$ コンダクタンスの計算に使われるパラメーター一覧

| 記号 | 説明 | 単位 |
|---|---|---|
| $\Delta$ | 炭素安定同位体分別 | ‰ |
| $A$ | 光合成速度 | $\mu$mol $m^{-2}$ $s^{-1}$ |
| $P_a$ | 外気の二酸化炭素分圧 | mol $mol^{-1}$ |
| $P_s$ | 葉の表面の $CO_2$ 分圧 | mol $mol^{-1}$ |
| $P_e$ | チャンバに入る空気の $CO_2$ 分圧 | mol $mol^{-1}$ |
| $P_o$ | チャンバから出る空気の $CO_2$ 分圧 | mol $mol^{-1}$ |
| $P_i$ | 葉内の細胞間隙の $CO_2$ 分圧 | mol $mol^{-1}$ |
| $P_c$ | 葉緑体での $CO_2$ 分圧 | mol $mol^{-1}$ |
| $g_i$ | 葉内での $CO_2$ の拡散コンダクタンス | mol $m^{-2}$ $s^{-1}$ |
| $a_b$ | 境界層での $CO_2$ の拡散に伴う同位体分別 | ‰ |
| $a$ | 気孔での $CO_2$ の拡散に伴う同位体分別 | ‰ |
| $a_i$ | 水中での $CO_2$ の水和・拡散に伴う同位体分別 | ‰ |
| $b$ | Rubisco と PEP-carboxylase による同位体分別 | ‰ |
| $b'$ | Rubisco と PEP-carboxylase による同位体分別の仮定値 | ‰ |
| $a$ | 気孔での二酸化炭素の拡散に伴う同位体分別 | ‰ |
| $f$ | 光呼吸に伴う同位体分別 | ‰ |
| $\Gamma^*$ | 暗呼吸がないときの $CO_2$ 補償点 | mol $mol^{-1}$ |
| $e$ | 暗呼吸に伴う同位体分別 | ‰ |
| $R_d$ | 暗呼吸速度 | $\mu$mol $m^{-2}$ $s^{-1}$ |
| $k$ | Rubisco のカルボキシル化効率 | mol $m^{-2}$ $s^{-1}$ |
| $\delta_e$ | チャンバに入る $CO_2$ の安定同位体比 | ‰ |
| $\delta_o$ | チャンバから出る $CO_2$ の安定同位体比 | ‰ |

$$\Delta_i-\Delta=(b-a_i)\frac{P_i-P_c}{P_a}+(b'-b)\frac{P_i}{P_a}-\frac{\frac{eR_d}{k}+f\Gamma^*}{P_a} \quad (8)$$

気孔から葉緑体までの $CO_2$ の内部コンダクタンス（$g_i$）は，次のように定義される：

$$P_i-P_c=A/g_i \quad (9)$$

（4）式を（3）式に代入し，$b'=b$ と仮定すると

$$\Delta_i-\Delta=\frac{b-a_i}{g_i}\frac{A}{P_a}-\frac{\frac{eR_d}{k}+f\Gamma^*}{P_a} \quad (10)$$

$\Delta_i$，$\Delta$，$A$，$P_a$ は，炭素安定同位体比と光合成測定によって計算できる．また，$b$，$a_i$ は定数であると考えてよい．従って，$\Delta_i-\Delta$ に対して，$A/P_a$をプロットして，傾き（slope）を求めれば，その傾きから内部コンダクタンスが計算できる．

$$g_i=(b-a_i)/\text{slope} \quad (11)$$

傾きからではなく，測定データから直接拡散コンダクタンスを計算することもできる．暗呼吸速度に伴う同位体分別 $e$ は非常に小さく，無視できる[25]．また，光呼吸による同位体分別 $f$ の影響も無視できると考える．このとき内部コンダクタンスは

$$g_i=\frac{b-a_i}{\Delta_i-\Delta}\cdot\frac{A}{P_a} \quad (12)$$

ここでは $b$ と $a_i$ は，それぞれ $b=30$ ‰，$a_i=1.8$ ‰．$b=28$ ‰とする場合もある．

仮想的な同位体分別 $\Delta_i$は，次のようにして求める．(6)式で，境界層の拡散抵抗が無視できる（$P_a=P_s$）と仮定して，$a=4.4$ ‰，$b'=30$ ‰とおき，次式で計算する．$P_a$，$P_i$ は，ガス交換測定によって求められる．

$$\Delta_i=4.4(P_a-P_i)/P_a+30P_i/P_a \quad (13)$$

実際に生じる同位体分別 $\Delta$ は次のようにして計算する．

$$\Delta=\frac{\xi(\delta_o-\delta_e)}{1+\delta_o-\xi(\delta_o-\delta_e)} \quad (14)$$

$$\xi=\frac{P_e}{P_e-P_o} \quad (15)$$

$P_e$，$P_o$ は，チャンバの入り口と出口の $CO_2$ 分圧で，ガス交換測定によって測定される．$\delta_e$，$\delta_o$は，チャンバの入り口と出口の $CO_2$ の安定同位体比で，真空ラインを使って集めたガスの炭素安定同位体比測定により求められる．

## 1.b.3　窒素安定同位体比

### 1.b.3.1　窒素安定同位体比とは

植物の安定同位体でよく測定されているのは炭素についで窒素である．窒素の安定同位体比は光合成のプロセスとは直接関係しないが，ここで簡単に変動原理と利用方法を紹介する．窒素には 2 つの安定同位体 $^{14}N$ と $^{15}N$ がある．$^{14}N$ は存在比が高く大気中の窒素の 99.633％を占める．大気の窒素の同位体組成は一定であるため[28]，大気中の窒素は窒素安定同位体の標準物質として使われている（表 4）．すなわち，大気中窒素の安定同位体比は 0 ‰である．窒素安定同位体比は $\delta^{15}N$ と標記され（表 3），自然界にある植物の $\delta^{15}N$ は−10〜＋10 ‰である[36]．

植物体の窒素安定同位体比の測定方法は 1.4 章を参照されたい．

### 1.b.3.2　窒素安定同位体比の決定要因と利用方法

炭素の安定同位体と同じように，植物の $\delta^{15}N$ は窒素供給源の $\delta^{15}N$，窒素代謝過程での同位体分別，窒素化合物の組成や転流などに影響を受ける（表 9）．植物への窒素供給源は，窒素固定をしない植物では土壌窒素，窒素固定する植物では土壌と大気中の窒素である．土壌表面の窒素は大気と比較すると $^{15}N$ が多く，$\delta^{15}N$ の平均値はおよそ 9.2 ‰である[2]．一般的には，土壌が深くなるほど $^{15}N$ が増加し，$\delta^{15}N$ の値はよりプラスになる[29]．

炭素の場合と同様，窒素についてもほとんどの反応では重い同位体 $^{15}N$ が分別される．ただし，窒素固定反応では軽い同位体 $^{14}N$ が分別される場合がある（表 9）．そのため，炭素の場合とは異なり，植物の $\delta^{15}N$ はプラスの値もマイナスの値もとりうる．植物の部位別の $\delta^{15}N$ を表 10 に示す[1]．

植物によって利用される土壌窒素は，硝酸態（$NO_3^-$）

**表 9**：さまざまなプロセスにおける窒素安定同位体分別[1]

| 過程 | 同位体分別係数 |
|---|---|
| 非生物的過程 | |
| 水中での $NO_3^-$，$NH_3$，$NH_4^+$ の拡散 | 1.000 |
| 大気中での $NO_3^-$，$NH_3$，$NH_4^+$ の拡散 | 1.018 |
| 土壌中の生物的過程 | |
| $N_2O$ 還元 | 1.034〜1.039 |
| 脱窒 | 1.028〜1.033 |
| 窒素固定 | 0.991〜1.004 |
| 硝化 | 1.015〜1.035 |
| 植物 | |
| アンモニア同化 | 1.009〜1.020 |
| 硝酸同化 | 1.003〜1.030 |

表 10：カリフォルニア砂漠の根粒をもつマメ科植物 *Dalea schottii* における部位別の窒素安定同位体比[1)]

| 組織 | $\delta^{15}$N（‰） |
|---|---|
| 葉 | −1.5（0.2） |
| 果実・花 | −1.1（0.7） |
| 茎 | −3.1（0.1） |
| 根 | −3.0（0.6） |
| 根粒 | +6.3（1.4） |
| 植物全体 | −2.0（0.2） |

かアンモニア態（$NH_4^+$）となっている．硝酸態で窒素が吸収される場合，最大 20 ‰の分別が生じる[36)]．また，窒素固定を行う植物の場合，植物組織の中では根粒に $^{15}$N が濃縮されて他の組織よりも $\delta^{15}$N が高くなる（表 10）．炭素と比べると窒素の同位体分別は小さく，また同位体分別がよく分かっていない反応過程も多いため，窒素の $\delta^{15}$N と植物の生理的な過程とを関連づけるのは難しい場合が多い．

$\delta^{15}$N は植物による窒素固定の研究に広く利用されている[1)30)]．窒素の同位体分別は小さいため，植物の $\delta^{15}$N は窒素供給源の安定同位体比を反映すると考えてよい．窒素固定をする植物の窒素供給源は土壌と大気の 2 つである．土壌表面の窒素は平均 9.2 ‰であり，大気中窒素の $\delta^{15}$N は 0 ‰である．したがって，窒素固定を行って大気から窒素の供給を受けているマメ科の植物は，窒素固定をしない植物よりも $\delta^{15}$N が低くなる傾向を示す（図 6）．

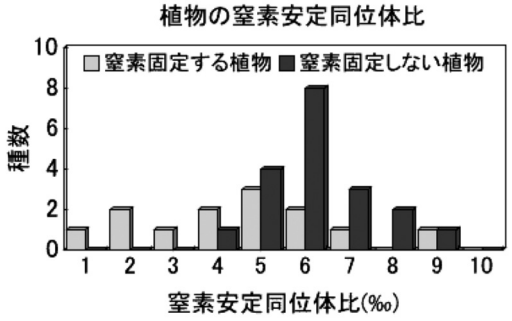



図 6：窒素固定を行なう植物と行なわない植物における窒素安定同位体比[2)]．

## 1.b.4　酸素・水素安定同位体比

### 1.b.4.1　酸素・水素安定同位体比とは

植物の水素安定同位体比 $\delta$D および酸素安定同位体比 $\delta^{18}$O は，植物による水利用と深い関係がある．安定同位体比の標準物質としては，水素も酸素も共に標準海水（standard mean ocean water: SMOW）が用いられる（表 4）．水素安定同位体比は非常に変動が大きく，降水では 400 ‰にもなる[1)]．また降水の $\delta$D と $\delta^{18}$O との間には正の直線的な関係が成立することが知られており，天水線 Meteoric Waterline といわれている[1)]．

### 1.b.4.2　水素・酸素安定同位体比の決定要因と利用方法

水が蒸発するときには重い安定同位体が分別されるため，水蒸気には軽い安定同位体（$^{16}$O，H）が多く，残った水には重い安定同位体（$^{18}$O，D）が多くなる．逆に水蒸気が凝固して水滴になるときには，軽い安定同位体が分別される．蒸発と凝固による同位体分別の結果，気温と降雨の安定同位体比との間には正の相関関係が成立し，気温が高いほど降水の $\delta^{18}$O はプラスになる[31)]．

葉の水の $\delta$ D および $\delta^{18}$O は，供給源の水の $\delta$D および $\delta^{18}$O と，蒸散の影響を受ける．このことから，炭素安定同位体比 $\delta^{13}$C と同様に，植物の基質である水の起源を $\delta$D および $\delta^{18}$O から推定することが可能である[32)]．また，植物の水利用と関連させることも可能であると考えられるが，蒸散と同位体分別との関係モデル（Craig-Gordon モデル[33)]）は実測値とのずれが大きく未だに不完全であり，現在も修正が試みられている[34)]．

## 参考文献


1）E. T. Nilsen & D. M. Orcutt, The physiology of plants under stress, abiotic factors. New York, John Willey & Sons, 1996, P.689

2）J. R. Rhleringer & C. B. Osmond, Stable isotopes, ed. R. W. Pearcy, J. Ehleringer, H. A. Mooney and P. W. Rundel, Doedrecht, Kluwer Academic Publishers, 2000, P.281

3）D. Widory & M. Javoya, Earth Planet. Sci. Lett. **215** (2003) P.289

4）Y. T. Hanba, S. Mori, T. T. Lei, T. Koike & E. Wada, Oecologia **110** (1997) P.253

5）J. C. Vogel, Variability of carbon isotope fractionation during photosynthesis, ed. California, Academic Press, Inc., 1993, P.29

6）Farquhar, G. D, O'Leary, M. H, Berry & J. A, Aust J Plant Physiol **9** (1982) P.121

7）半場祐子，「光合成機能の評価 3 ：炭素安定同位体」，種生物学会編，光と水と植物のかたち ── 植物生理生態学入門 ──，文一総合出版，2003．P.259

8）G. D. Farquhar, Aust J Plant Physiol **72** (1993) P.245

9）N. Buchmann, J. Brooks, K. Rapp & J. Ehleringer, Plant Cell Environ **19** (1996) P.392

10）J. Kubásek, J. Šetlík, S. Dwyer & J. Šantrůček, Photosynth Res **91** (2007) P.47

11) Y. Tazoe, K. Noguchi & I. Terasima, Plant Cell Environ **29** (2006) P.691
12) M. M. Bender & D. Smith, J. Br. Grassld Soc. **28** (1973) P.97
13) R. F. Sage, L. Meirong & R. K. Monson, The taxonomic distribution of $C_4$ photosynthesis., ed. California, USA, Academic Press, 1999, P.551
14) R. F. Sage, New Phytol **161** (2004) P.341-370
15) J. R. Ehleringer, A. E. Hall, & G. D. Farquhar, Stable isotopes and plant carbon-water relations, California, Academic Press (1993) P.539
16) S. Ponton, L. B. Flanagan, K. P. Alstad, B. G. Johnson, K. Morgenstern, N. Kljun, T. A. Black & A. G. Barr, Global Change Biology **12** (2006) P.294
17) Y. T. Hanba, H. Kogami & I. Terashima, Isotopes Environ. Health Stud. **39** (2003) P.5
18) U. Seibt, A. Rajabi, H. Griffiths & J. A. Berry, Oecologia **155** (2008) P.441
19) J. Flexas, M. Ribas-Carbó, A. Diaz-Espejo, J. Galmés & H. Medrano, Plant Cell and Environment **31** (2008) P. 602
20) F. Loreto, P. C. Harley, M. Di & T. D. Sharkey, Plant Physiol **98** (1992) P.1437
21) J. Lloyd, J. P. Syvertsen, P. E. Kriedemann & G. D. Farquhar, Plant, Cell and Environment **15** (1992) P.873
22) M. Lauteri, A. Scartazza, M. C. Guido & E. Brugnoli, Funct Ecol **11** (1997) P.675
23) Y. T. Hanba, H. Kogami & I. Terashima, Plant Cell and Environment **25** (2002) P.1021
24) 半場祐子, 日本生態学会誌 **57** (2007) P.361
25) S. Von Caemmerer & J. R. Evans, Aust J Plant Physiol **18** (1991) P.287
26) P. C. Harley, F. Loreto, G. D. Marco & T. D. Sharkey, Plant Physiol **98** (1992) P.1429-1436
27) G. J. Ethier & N. J. Livingston, Plant Cell Environ **27** (2004) P.137-153
28) A. Mariotti, Nature **303** (1983) P.685
29) M. I. Makarova, J. H. C. Cornelissen, R. S. P. V. Logtestijn & B. Glasserc, Soil Biology and Biochemistry **40** (2008) P.1082
30) T. L. Pons, K. Perreijn, C. V. Kessel & M. J. A. Werger, New Phytol **173** (2007) P.154
31) M. M. Barbour, L. A. Cernusak & G. D. Farquhar, Factors affecting oxygen isotope ratio of plant organic matter., ed. L. B. Flanagan, J. R. Ehleringer and D. E. Pataki, California, Elsevier Academic Press, 2007, P.9
32) H. Asbjornsen, G. Shepherd, M. Helmers & G. Mora, Plant and Soil **308** (2008) P.69
33) H. Craig & L. Gordon, Deuterium and oxygen-18 variations in the ocean and the marine atmosphere. I, ed. E. Tongiorgi, Proceedings of a Conference on Stable Isotopes in Oceanographic Studies and Palaeotemperatures., Lischi and Figli, Pisa, Italy, 1965, P.9-130
34) F. Ripullone, N. Matsuo, H. Stuart-Williams, S. C. Wong, M. Borghetti, M. Tani & G. Farquhar, Plant Physiol **146** (2008) P.729
35) M. H. O'Leary, Bio Science **38** (1988) P.328
36) R. D. Evans, Trends in Plant Science **6** (2001) P.121

# 1．個葉から葉緑体スケールのガス交換
## c. 呼吸速度（$CO_2$ 発生速度）測定

野口　　航[1)]

動物，植物を問わず，酸化的呼吸は糖などの基質を，$O_2$ を消費して $CO_2$ と $H_2O$ に分解し，その過程で ATP を生成する反応である．植物の葉では光照射下において，同時に $O_2$ を消費して $CO_2$ を発生する光呼吸反応が行われる．そのため，ミトコンドリアの TCA 回路を経由した呼吸を暗呼吸（dark respiration）と呼ぶ．本章では植物組織の $CO_2$ 発生速度としての暗呼吸速度の測定法について紹介する．

## Measurement of $CO_2$ efflux rate

Ko Noguchi

Mitochondrial respiration consumes $O_2$ in the respiratory chain and produces $CO_2$ from the TCA cycle. In illuminated leaves, photorespiration also consumes $O_2$ and produces $CO_2$. In this chapter, I introduce methods of $CO_2$ efflux rate from the TCA cycle in darkened or illuminated leaves.

### 1.c.1　呼吸系における $CO_2$ 発生反応

植物の呼吸系における $CO_2$ 発生は，ミトコンドリアの TCA 回路（クエン酸回路）のピルビン酸脱水素酵素複合体（pyruvate dehydrogenase complex, PDC），イソクエン酸脱水素酵素（NAD-dependent isodehydrogenase, NAD-IDH），2-オキソグルタル酸脱水素酵素複合体（2-oxoglutarate dehydrogenase complex, OGDC），リンゴ酸酵素（malic enzyme, ME）の 4 反応でおこる（図 1）．また，酸化的ペントースリン酸回路の 6-ホスホグルコン酸脱水素酵素（6-phosphogluconate dehydrogenase）の反応においても，1 分子の 6-ホスホグルコン酸から 1 分子の $CO_2$ が発生する（図 2）[1)]．

ピルビン酸が唯一のミトコンドリア基質として使われ，TCA 回路で完全に分解される場合には，1 分子のピルビン酸から PDC，NAD-IDH，OGDC の反応により 3 分子の $CO_2$ が発生する．しかし，硝酸同化に TCA 回路からクエン酸やイソクエン酸が炭素骨格として供給される場合には，TCA 回路が完全に回転できない．そのときには，補充反応としてオキサロ酢酸やリンゴ酸が TCA 回路の基質として使われ，ピルビン酸の供給のためにリンゴ酸酵素が働く場合がある．また，生合成反応に NADPH が供給される場合には，酸化的ペントースリン酸回路から供給されうる．

1）東京大学　大学院理学系研究科　生物科学専攻

### 1.c.2　$CO_2$ 発生速度としての暗呼吸速度の測定

暗呼吸速度は暗黒下で通常，光合成測定装置を用いて測定する．栽培時の温度・湿度条件で測定すると良い．以前は，自作のガス交換用同化箱（チャンバー）に葉を

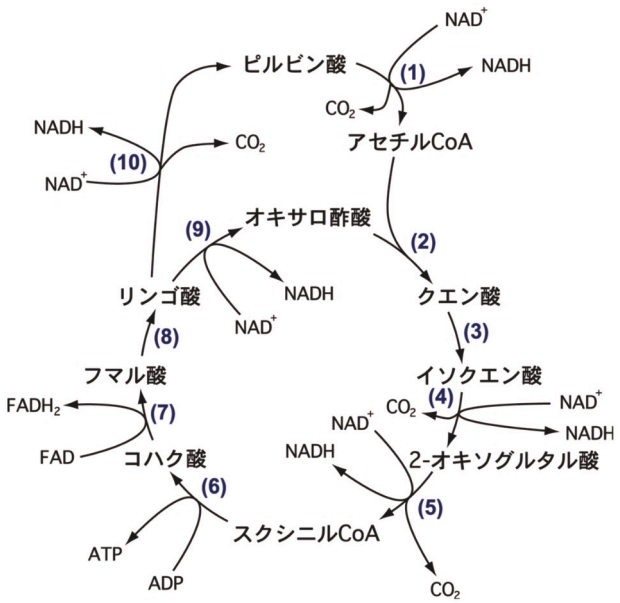



**図 1**：植物ミトコンドリアの TCA 回路．(1) ピルビン酸脱水素酵素複合体（PDC），(2) クエン酸合成酵素，(3) アコニターゼ，(4) イソクエン酸脱水素酵素（NAD-IDH），(5) 2-オキソグルタル酸脱水素酵素複合体（OGDC），(6) スクニシル CoA リガーゼ，(7) コハク酸脱水素酵素，(8) フマラーゼ，(9) リンゴ酸脱水素酵素，(10) リンゴ酸酵素（ME）．

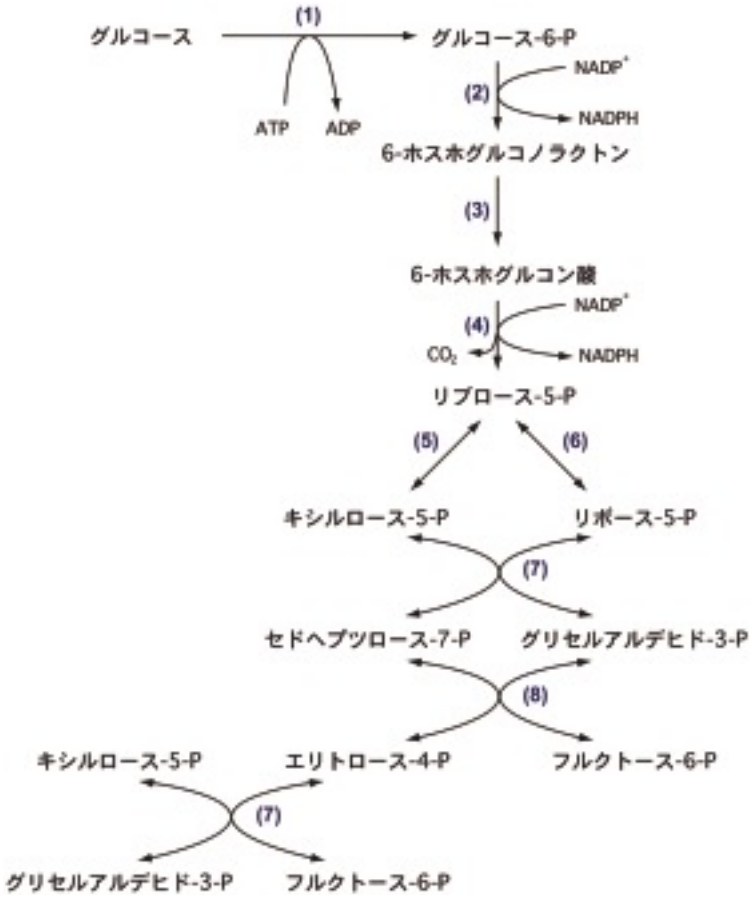



**図2**：酸化的ペントースリン酸回路．(1)ヘキソキナーゼ，(2)グルコース-6-リン酸脱水素酵素，(3)ラクトナーゼ，(4)6-ホスホグルコン酸脱水素酵素，(5)リブロースリン酸エピメラーゼ，(6)リボースリン酸イソメラーゼ，(7)トランスケトラーゼ，(8)トランスアルドラーゼ．

挟み，同化箱の入口と出口の $CO_2$ 濃度差を差分式 IRGA（例えば LiCor 社製　ガス交換測定装置　LI-6262 など）で測定していたが，近年は Li-Cor 社製　携帯型ガス交換測定装置　LI-6400 を用いて測定した例がよく報告されている[2]．

LI-6400 では，ある程度葉温や湿度を調節でき，測定された $CO_2$ 濃度や $H_2O$ 濃度から自動で暗呼吸速度を計算してくれるため，非常に簡便である．しかし，葉の暗呼吸速度は光合成速度に比べて，速度の絶対値が小さいので，測定の際には注意が必要である．LI-6400 を用いる場合には，6 $cm^2$ のチャンバーもしくは 2 $cm^2$ のクロロフィル蛍光を同時に測定できるユニットのチャンバーで，葉のガス交換速度を測定することが多い．暗呼吸速度の低い葉の場合には，チャンバーサイズが小さいとチャンバーの入口と出口の $CO_2$ 濃度差が十分に得られず，安定した値が得られない場合もある．また，LI-6400 ではチャンバーのガスケットに葉を挟んで測定する．測定時のチャンバー内の $CO_2$ 濃度が周囲の $CO_2$ 濃度と差がある場合（例えば，高 $CO_2$ 条件下での暗呼吸速度の測定）には，チャンバーのガスケットを通じて $CO_2$ がリークしうる[3]．特にチャンバーの入口と出口の $CO_2$ 濃度差を上げるために，流量を下げたときに起こりやすい．リークを最小限にするためには，パージ装置をチャンバーのガスケット周りにつけるとかなり有効である[4]．

葉の暗呼吸速度は光照射後に減少することが多い[5,6]．光照射後には葉の光合成産物すなわち呼吸基質が減少するので，暗呼吸速度が減少すると考えられている[7]．また，暗呼吸速度は，夜間の半ばもしくは終わり頃に再び増加する例も報告されている[8,9]．Midnight rise of respiration もしくは morning rise of respiration と呼ばれる現象である．この現象の理由として，内在性リズムもしくは呼吸 ATP の需要量の一時的な増加と考えられているが不明である．いずれにしろ，夜間の暗呼吸速度は一定ではなく変化するため，葉の積算炭素獲得量などの計算には注意が必要である．

## 1.c.3　呼吸商

組織の $CO_2$ 発生速度の測定からでは，どのような反応由来の $CO_2$ を測定しているかは分からない．しかし，酸素電極などで $O_2$ 消費速度を同時に測定し，呼吸商（respiratory quotient, RQ，$CO_2$ 発生速度／$O_2$ 消費速度）を求めることにより，呼吸基質や呼吸系からの還元力（NADPH や NADH）の利用程度を推定できる．

タンパク質や脂肪のように，分子中酸素の割合が炭水化物よりも少ない物質が呼吸基質になる場合には，呼吸商は 1 よりも小さくなり，それぞれ約 0.8，0.7 となる．トウゴマやナタネなど脂肪を多く含む種子では，発芽時の呼吸商は 1 よりも小さくなり，デンプンを多く含む種子では，呼吸商は 1 に近い．一方，リンゴ酸などの有機酸が基質になる場合には，呼吸商は 1 よりも大きくなる[10]．また，生理的な反応が呼吸商に影響する場合がある．硝酸イオンをアンモニウムイオンに変換する硝酸同化反応では $CO_2$ が放出されるため，硝酸態を与えた植物の根の呼吸商は，アンモニア態を与えた根の呼吸商よりも高くなることが知られている．成長速度の速い植物の根では，硝酸同化がさかんなために成長速度の遅い植物の根に比べて，呼吸商が高い[10]．

## 1.c.4　光照射下の呼吸速度の測定

光照射下の $C_3$ 植物の葉では，Rubisco もしくは PEPCase による $CO_2$ 固定，光呼吸経路の glycine dehydrogenase complex（GDC）からの $CO_2$ 発生（$R_{PR}$）と TCA 回路からの $CO_2$ 発生（$R_{day}$[注1]）が同時に起こり（図 3），ガス交換測定装置ではその正味の速度を測定している．Rubisco kinetics のパラメータを求めるためや総光合成速度を求めるためにも，光照射下における $R_{day}$ を推定する方法がいくつか報告されている．

### 1.c.4.1　Laisk 法

$R_{day}$ を求めるために良く用いられている方法である[11–13]．$CO_2$ 交換速度（$A$）は，Rubisco の carboxylation 速度（$v_c$）と oxygenation 速度（$v_o$），$R_{day}$ により次式のようにまとめられる．

$$A = v_c - 0.5v_o - R_{day}$$

細胞間隙 $CO_2$ 濃度（$c_i$）が減少していくと，$v_c$ と $0.5v_o$ が等しい値になる濃度がある．そのときの $c_i$ を $\Gamma^*$ と呼び，$\Gamma^*$ のときに $CO_2$ 交換速度（$A$）は $R_{day}$ と等しくなる．実際には図 4 のように，葉に当てる光強度を変えて A-$c_i$ カーブを測定し，複数の A-$c_i$ カーブの交点として，$\Gamma^*$ と $R_{day}$ を求める．

Laisk 法は $c_i$ によって $R_{day}$ が変化しないということが前提となる．また $c_i$ が低いときにはしだいに光合成産物が減少していくので $R_{day}$ が変化しうる．すばやい測定が必要となる[14]．

### 1.c.4.2　Kok 法

光合成速度の光依存性（光—光合成曲線）を求めると，

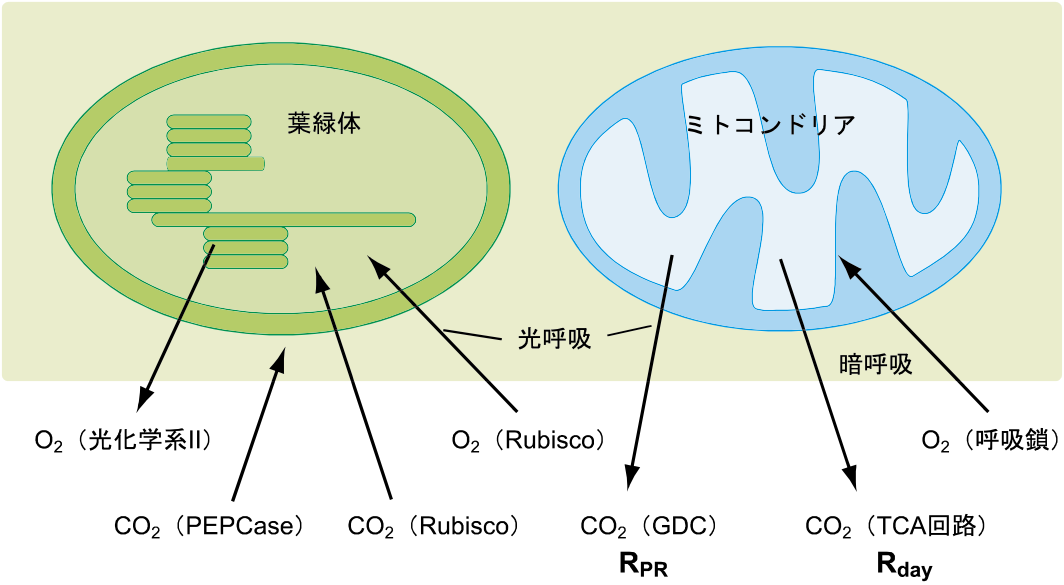



図 3：光照射下の葉における $CO_2$ と $O_2$ の出入り．

[注1] $R_d$ とも略される．

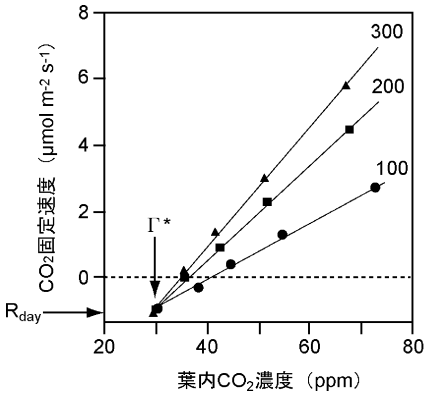



図 4：イネ科ナガハグサ属コイナゴツナギ（カナダブルーグラス）の葉の $CO_2$ 固定速度と葉内 $CO_2$ 濃度との関係（A-$C_i$ 曲線）[13]．図内の数字は光合成測定時の葉に照射した光強度（光量子束密度 $\mu$mol photon $m^{-2}s^{-1}$）．直線は各光強度のデータの回帰直線を示す．$v_c$ と $0.5v_o$ が等しくなる $c_i$ を Γ*，そのときの $CO_2$ 放出速度が $R_{day}$ となる．

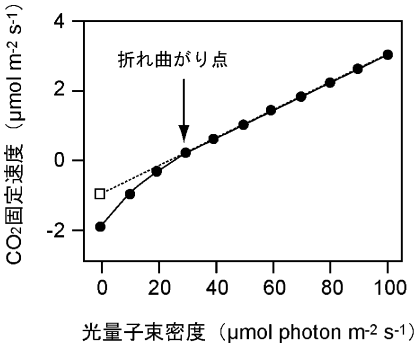



図 5：Kok 効果を示している光-光合成曲線．文献値[16]をもとにした典型的な $CO_2$ 固定速度のデータが黒丸で示しており，弱光下で曲線が折れ曲がっている．直線近似できるデータの回帰直線を点線で示し，外挿点の白四角のシンボルが，光照射下の TCA 回路の $CO_2$ 放出速度（$R_{day}$）を示す．

図 5 のように曲線の折れ曲がりがしばしば測定される．これは Kok 効果と呼ばれる[15]．折れ曲がり点よりも光強度が強いデータに対する回帰直線を外挿して，$R_{day}$ を $y$ 切片として求める．Kok 法の問題点は，光強度が下げると $c_i$ が増加するために，$R_{day}$ を過少評価しがちであることである．しかし，$c_i$ を一定にしても Kok 法から求めた $R_{day}$ は Laisk 法よりも低いという報告もある[16]．Laisk 法と Kok 法のどちらの方法でも，暗呼吸速度（$R_n$）よりも $R_{day}$ の方が低い．

### 1.c.4.3 $^{14}C$ ラベル

Laisk 法も Kok 法でも，TCA 回路から放出された $CO_2$ が葉内で Rubisco により再固定されるフラックス（$R_{dr}$）を考慮することができない（図 6）．どちらの方法でも実際に測っているフラックス（$R_{ex}$）は，$R_{day}$ と $R_{dr}$ の差である．$^{14}CO_2$ でラベルしてパルスチェイスする方法では，$R_{dr}$ を考慮した方法が考案されている[17]．

彼らは $^{14}CO_2$ であらかじめ葉の光合成産物をラベルしておき，その後，$^{12}CO_2$・光照射下で $^{14}CO_2$ として出て

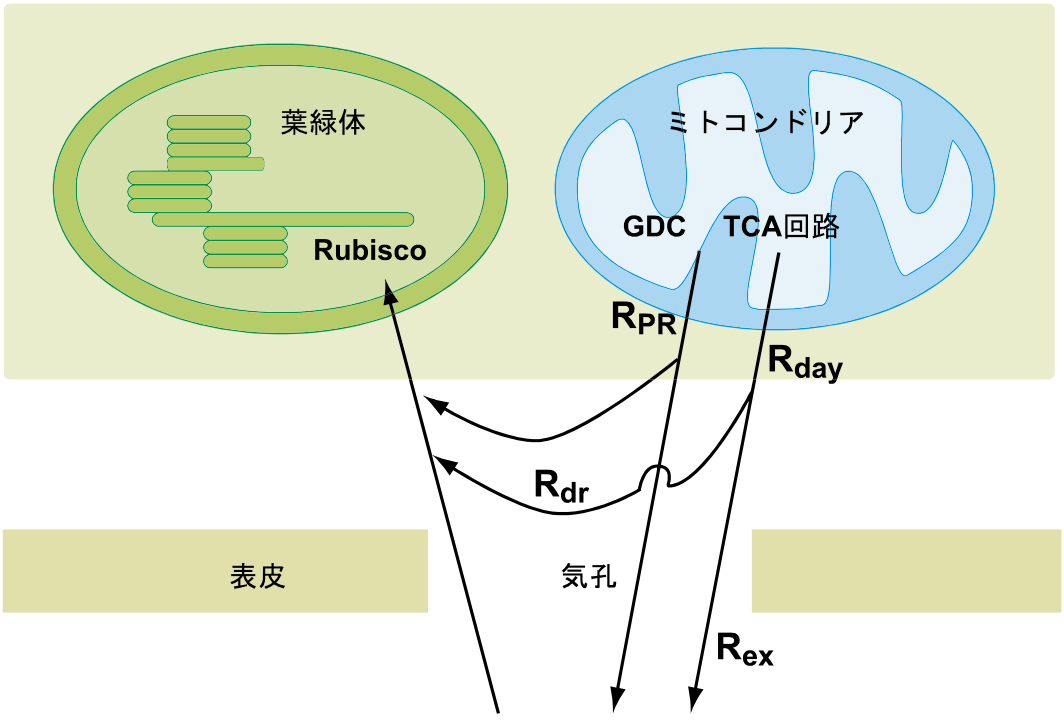



図 6：光照射下の葉において，ミトコンドリアの TCA 回路から放出された $CO_2$（$R_{day}$）の一部（$R_{dr}$）は，葉内で Rubisco により再固定され，葉外に出ていくフラックス（$R_{ex}$）は $R_{day}$ の一部である．

くるフラックスを測定している．そのときに，2つの$O_2$濃度条件，21%　$O_2$条件と光呼吸が抑制される1.5%　$O_2$条件，で$^{14}CO_2$フラックスを測定し，光呼吸経路からの$CO_2$発生とTCA回路からの$CO_2$発生とを分けている．さらに3%　$CO_2$条件下でも測定している．3%　$CO_2$下では細胞間隙$CO_2$の$^{14}C/^{12}C$比が非常に低く抑えられ，TCA回路から発生した$^{14}CO_2$がRubiscoで再固定される可能性が低い．

この方法は，$O_2$濃度や$c_i$が変化したときに，ミトコンドリアの呼吸速度（TCA回路の速度）が変化しないことが前提となっている．この方法でもとめた$R_{day}$も暗呼吸速度$R_n$よりも低い[17,18]．

### 1.c.4.4　安定同位体を利用する方法

Gas-houndと呼ばれるLi-Cor社製のLI-800を用いる方法と，同位体質量分析計を用いる方法が報告されている．

LI-800は$^{12}CO_2$に比べて$^{13}CO_2$の感度が非常に低い（1.7%程度）．その感度の差を利用して$R_{day}$を求める[19]．$C_4$植物において，通常の$CO_2$濃度下では光呼吸はほとんど働かない．そのため光照射下の$CO_2$発生は，TCA回路からの$CO_2$発生と維管束鞘細胞からの$CO_2$リークである．葉を挟んだ光照射下のチャンバーに，あらかじめ$^{12}CO_2$のみを含む空気を流しておき，$^{13}CO_2$のみを含む空気に切り替えた後に，葉から放出される$^{12}CO_2$をLI-800で測定する．維管束鞘細胞からの$CO_2$リークはすばやく$^{13}CO_2$に置き換わるために，葉から放出される$^{12}CO_2$は，$R_{day}$からRubiscoに再固定されるフラックス（$R_{dr}$）を引いた$R_{ex}$になる．また同時に$^{13}CO_2$条件下の$CO_2$固定速度（$P_n$）や気孔コンダクタンス（$g_s$）を$^{13}CO_2$にも高い感度を示すガス交換測定装置（例えばLI-6262）で測定しておく．それらのデータと下記の式から$R_{day}$（$=R_{ex}+R_{dr}$）を求める．

$$^{12}C_i = R_{ex} \Big/ g_s$$

$$R_{dr} = {}^{12}C_i \Big/ {}_{13}C_i \times P_n$$

Loretoらは上記の方法でトウモロコシの葉の$R_{day}$は$R_n$とほぼ同じ値を示すことを報告している[19]．また$C_3$植物でも同様の方法を用いて$R_{day}$を推定していたが，PEPCaseの$CO_2$固定や光呼吸による$CO_2$発生を抑えることが難しく，正確な$R_{day}$を求めることはできなかった[20]．

同位体質量分析計を用いて，$^{12}CO_2$と$^{13}CO_2$を同時に測定することにより$R_{dr}$や$R_{day}$を推定することも報告されている[21]．彼らの方法でも，高$CO_2$濃度条件では光呼吸が抑えられ，TCA回路からの$CO_2$発生は変化しないという前提が，$R_{day}$を推定するために必要である．

## 参考文献


1）H.-W. Heldt「植物生化学」，金井龍二（訳），スプリンガーフェアラーク，2000，p.150．
2）L. F. Ow, K. L. Griffin, D. Whitehead, A. S. Walcroft & M. H. Turnbull, New Phytol. **178** (2008) P.123.
3）D. Bruhn, T. N. Mikkelsen & O. K. Atkin, Physiol. Plant. **114** (2002) P.57.
4）S.-I. Miyazawa & I. Terashima, Plant Cell Env. **24** (2001) P.279.
5）J. Azcón-Bieto & C. B. Osmond, Plant Physiol. **71** (1983) P.574.
6）K. Noguchi, K. Sonoike & I. Terashima, Plant Cell Physiol. **37** (1996) P.377.
7）K. Noguchi & I. Terashima, Physiol. Plant. **101** (1997) P.1.
8）J. Yamagishi, R. Ishii & A. Kumura, Jap. J. Crop Sci. **58** (1989) P.114.
9）K. Lee & S. Akita, Plant Prod. Sci. **3** (2000) P.38.
10）H. Lambers, F. S. Chapin III & T. L. Pons, Plant Physiological Ecology, New York, Springer, 2008, p.102.
11）A. K. Laisk, Kinetics of Photosynthesis and Photorespiration in $C_3$-Plants, Nauka, 1977.
12）A. Brooks & G. D. Farquhar, Planta, **165** (1985) P.397.
13）O. K. Atkin, M. H. M. Westbeek, M. L. Cambridge, H. Lambers & T. L. Pons, Plant Physiol. **113** (1997) P.961.
14）O. K. Atkin, A. H. Millar, P. Gardeström & D. A. Day, Photosynthesis: Physiology and Metabolism, ed. R. C. Leegood, T. D. Sharkey & S. von Caemmerer, Dordrecht, Kluwer, 2000, p.162.
15）B. Kok, Enzymologia **13** (1948) P.1.
16）R. Villar, A. A. Held & J. Merino, Plant Physiol. **105** (1994) P.167.
17）T. Pärnik & O. Keerberg, Physiol. Plant. **129** (2007) P. 34.
18）T. Pärnik & O. Keerberg, J. Exp. Bot. **46** (1995) P.1439.
19）F. Loreto, V. Velikova, D. I. Marco, Aust. J. Plant Physiol. **28** (2001) P.1103.
20）P. Pinelli & F. Loreto, J. Exp. Bot. **54** (2003) P.1761.
21）S. Haupt-Herting, K. Klug & H. P. Fock, Plant Physiol. **126** (2001) P.388.

# 1．個葉から葉緑体スケールのガス交換
## d. 酸素発生測定

野口　　航[1)]

酸素発生は光合成に特徴的な反応である．酸素は光化学系IIの水の酸化的分解の副産物として発生する．通常，光合成速度としての$O_2$発生速度は，密閉容器内の$O_2$濃度の一定時間の変化を，気相型もしくは液相型のポーラログラフ方式のClark型の酸素電極[1)]を用いて測定することが多い．本章では植物の葉や単離葉緑体の$O_2$発生速度の測定法について紹介する．

## Measurement of $O_2$ evolution rate

Ko Noguchi

Oxygen evolution is one of characteristic reactions in photosynthesis.　Oxygen evolution rate has been measured as changes in $O_2$ concentration in a closed chamber, using gas- or liquid-phase Clark-type oxygen electrode.　In this chapter, I introduce methods of oxygen evolution rate of leaves or isolated chloroplasts.

### 1.d.1　気相型酸素電極を用いた葉の酸素発生の測定

密閉容器内に葉を閉じ込め，容器内の気相の$O_2$濃度の変化をClark型酸素電極で測定する方法は，IRGAを用いた$CO_2$固定速度の測定システム（例えばLi-Cor社製LI-6400）に比べると，葉の光合成速度測定法としては，比較的安価で簡易な方法である．また微量のサンプルでも測定が可能である．現在，Hansatech社によって製造・販売[注1]されているこの気相型酸素電極システムは，1981年にDelieu & Walkerによって考案された[2)]．David Walker自身によってこのシステムの使用法についての丁寧な解説書が出版され[3)]，日本語訳も出版されている[4)]．ここでは使用法のごく簡単な紹介と注意事項をまとめる．

#### 1.d.1.1　システムの構成とセットアップ

**・気相型酸素電極システムの構成**

Hansatech社の気相型の酸素電極システムは図1のような構造をしている．現在販売されているのはポリプロピレン製のLD2/3である．葉片を入れる部分（リーフディスクウェル）の下部にClark型酸素電極ディスク（S 1）がはめ込まれ，その上下部分に温度調節のための水が循環できる．循環水の上部の窓を通して，専用の赤色LED光源（LH36/2R）やタングステンランプ光源（LS2）などを照射できる．またクロロフィル蛍光測定用のグラスファイバーを差し込めるポートもある．

Clark型酸素電極2つの電極（Pt電極とAg電極）間に，専用の制御器[注2]で電圧を加えると電解反応が起こり，溶存物質が各電極で酸化あるいは還元され，電解電流を生じる．ある一定の電圧（0.4－0.8 V）の時には各電極で以下の反応がおこる．

陰極（Pt）：$O_2+4H^++4e^-\rightarrow 2H_2O$

陽極（Ag）：$Ag+4Cl^-\rightarrow 4AgCl+4e^-$

電流は周囲の酸素濃度に比例するので，電流変化の測定から酸素濃度の変化を知ることができる．電流変化は電圧に変換・増幅され，記録計で読みとれる．可変抵抗を組み合わせて制御器を自作することも可能である．酸素電極の原理は（4）5aの章に詳しく記載されている[注3]．酸素電極は温度にきわめて敏感に反応するので，気相型の酸素電極システムに水を循環するための恒温槽は，精度の高いものが良い．

**・酸素電極の組立**

酸素電極は測定ごとに組み立てた方が良い．測定後には銀電極は酸化されるので，研磨用の酸化アルミニウムと綿棒等で銀電極を磨く．洗浄後，白金電極の上に電解

1）東京大学　大学院理学系研究科　生物科学専攻

注1　日本ではHansatech社（http://www.hansatech-instruments.com/index.htm）の製品は旭光通商株式会社（http://www.kyokko.com/index.html）が取り扱っている．

注2　Hansatech CB1-D3，Oxygraph，Oxytherm，Oxylabがある．CB1-D3は記録計でしかデータを読みとれないが，他はADコンバータが付いているので，パソコンで読みとれる．

注3　園池公毅博士のHP（http://sunlight.k.u-tokyo.ac.jp/proto/O2evolve.html）にも詳しく記載されている．

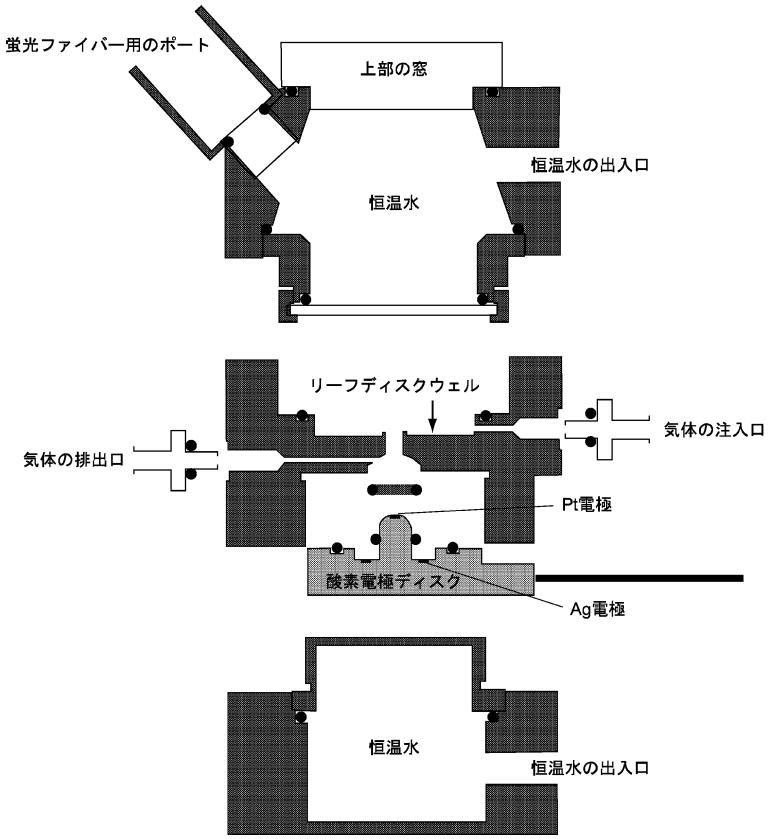



**図1**：Hansatech 社製の気相型の酸素電極システム（LD2/3）の模式図．光は上部の窓を通して照射し，左右の気体の出入り口に三方コックを取り付ける．上下のブロックに恒温槽からの水を循環して，温度を一定にする．

液[注4]をたらし，ペーパースペーサー[注5]と薄いテフロン膜[注6]を載せ，Oリングで固定する．固定する際には専用のメンブレンアプリケーター（A 2）があると，Oリングの取り付けが簡単である．取り付け後に，テフロン膜がきちんと張れているかを確認する．白金電極だけでなく，銀電極のおさまっている凹みも電極液で満たすと良い．Oリングの位置を確認し，組み立てた酸素電極を気相型システムに取り付ける．取り付け時に閉め過ぎると出力電圧が不安定になる．

・制御器と記録計の取付け

酸素電極と制御器をつなぎ，電圧をかける．Hansatech 社のアナログ制御器（CB1-D3）では出力電圧が増幅されるので，記録計への出力が 1.5 V 程度になるように出力制御ツマミで調節すると良い．恒温槽の水を酸素電極システムに循環し，温度を一定にする．酸素電極は 10 分くらいでほぼ安定になるが，銀電極が酸化してくるので，出力電圧はしだいにゆっくりと減少していく．

・測定前の注意事項

気相型酸素電極システムは閉鎖系の酸素濃度変化を測定するので，システムからのリークは大きな測定誤差につながる．リークの有無は次のように調べる．窒素やヘリウムなどのガスをシステムの横の三方コックから導入し，減少した出力電圧が増加しないかを確認するか，もしくはシリンジを用いて 0.5 mL 程度の空気を横の三方コックから導入し，増加した出力電圧が減少しないかを確認する．リークがあればOリングにゴミが付着しているか，三方コックがきちんと接続されているかを確認する．

[注4] 気相型酸素電極の電解液は，飽和 KCl 溶液，0.4 M ホウ酸緩衝液（pH9），1 M 重炭酸ナトリウム（1 M 炭酸ナトリウムで pH を 9 に合わせておく）を 1：1：2 で混ぜ合わせたものを用いる[2]．

[注5] タバコ紙が良い．直径 2 cm くらいの円に切り取る．真ん中に白金電極が見えるくらいの穴を開けると，応答が速くなる．

[注6] テフロン膜はタバコ紙よりもすこし大きめの円に切り取ると良い．Hansatech 付属のテフロン膜（S 4）は幅が 25 mm であり，ちょうどよい大きさとなっている．テフロン膜は薄い方が応答が良い．Hansatech から厚さ 0.0125 mm のテフロン膜（S 4）を購入できる

窒素やヘリウムなどのガスを導入することにより，電極の残留電流（ゼロ補正）と感度を確認できる．電極の残留電流はジチオナイト（$Na_2S_2O_4$，ヒドロサルファイトナトリウム）でも確認できるが，気相型だと使用しにくい．測定前にリーフディスクウェルに当たる光強度を測定しておくと良い．水の層を通って葉に当たるので，光強度が弱くなる．

### 1.d.1.2　酸素発生速度の測定

ここではアナログ制御器 CB1-D3 と記録計を用いたときの測定例をまとめる．デジタル制御器（Oxygraph など）を用いた時の操作法はソフトウェアの説明書も確認してほしい．

1）リーフディスクウェルに葉片を入れる前に，大気条件下（21% $O_2$, 380 ppm $CO_2$）での記録計の出力電圧を確認する．電極の酸化で出力電圧が徐々に減少していくので，測定前と測定後に確認した方がよい．ゼロ補正を行ったときの出力電圧と大気条件下での出力電圧の差が，「21% $O_2$ と平衡にあるときの電圧」とする．

2）葉面積を 10 $cm^2$ に切り取れる付属カッター（941002）を用いて葉を切り取り，しばらく水に浮かべておいたあと，リーフディスクウェルにセットする．葉面積が小さい葉の場合には，別に葉面積を測定する必要がある．葉片の下に，機器セットに付属のステンレスディスク，毛細管マット，スポンジを敷く[注7]．毛細管マットは測定中に葉が乾燥しないように水で適度に湿らせておく（濡らすのではない）．

3）酸素電極システムの上部を固定し，両端の三方コックを閉じた後に，リーフディスクウェル内の体積を求める．リーフディスクウェルに横の三方コックから 0.5 mL の大気をシリンジで導入し，出力電圧の変化からリーフディスクウェル内の有効体積を求められる[注8]．また同時にリークも確認できる．リーフディスクウェル内の有効体積は葉の厚さなどによって変化するが，4−6 mL 程度になる．

4）リーフディスクウェル内の有効体積は小さいので，大気条件（380 ppm $CO_2$）で測定するとすぐに $CO_2$ を消費しきってしまう．多くの例では 5 % $CO_2$ 濃度という高い $CO_2$ 濃度条件で測定している．5 % $CO_2$ 濃度になるようにボンベから三方コックに気体を導入しても良いし，簡易な方法として呼気を導入しても良い．呼気を導入する場合には，記録計の出力電圧を見ながら約 5 % $CO_2$（=16% $O_2$）の電圧まで導入後，両端の三方コックを閉じ，リーフディスクウェルを閉鎖系にする．

5）まず，暗黒下での呼吸速度を測定し，出力電圧が安定しているかを調べる．記録計の電圧変化が一定になるまで待つ．出力電圧の変化が小さい場合には，記録計のレンジを変更するか，制御器 CB1-D3 の Back-off ツマミと出力制御ツマミでレンジを拡大すると良い．

6）光を照射する．光強度を変える場合には，変化後に葉はすぐに応答できないので 5 から 10 分程度光を照射した後に，記録計の電圧変化を読みとる．

7）葉が光合成を行うとチェンバー内の $CO_2$ 濃度が減少する．4 % $CO_2$ 以下（=17% $O_2$ 以上）になったら，再度両端の三方コックを開けて呼気を導入する．

### 1.d.1.3　酸素発生速度の計算法

光合成速度（$P$）は，通常 $\mu$mol $O_2$ $m^{-2}s^{-1}$ の単位として表す．以下のパラメータ $A$ から $E$ を測定値として求め，光合成速度を計算する．

| | |
|---|---|
| 大気（21% $O_2$）と平衡状態にあるときの電圧 | $A$[V] |
| ある一定時間あたりの電圧の変化 | $B$[V $s^{-1}$] |
| 測定温度における 21% $O_2$ のモル濃度 | $C$[mol $L^{-1}$] |
| リーフディスクウェル内の有効体積 | $D$[L] |
| 葉面積 | $E$[$m^2$] |

$$P=\frac{B\cdot C\cdot D}{A\cdot E}\cdot 10^{-6}$$

### 1.d.1.4　測定時の注意事項

最も起こる測定誤差の原因がリーフディスクウェルのリークである．O リングや三方コックの摩耗を測定前に確認した方が良い．またリーフディスクウェル内の湿度が高い場合には，上のガラスが曇る時がある．葉に当たる光強度が下がるので，上部をはずして拭く必要がある．

気相型酸素電極システムはクロロフィル蛍光測定用のポートが上部に付属している．クロロフィル蛍光シグナルが小さい場合には，上部の水槽のプラスティックの蓋を改造し，光照射と蛍光測定用のグラスファイバーを葉に近づけられるようにしても良い．

---

[注7] リーフディスクの下に敷くステンレスディスク，毛細管マット，スポンジの順は付属のマニュアル，もしくは文献を参考にしてほしい．厚い葉を用いるときにはスポンジを外しても良い．

[注8] リーフディスクウェル内の有効体積は，次の式で求められる．

$$v=\frac{R_1}{R_2-R_1}\cdot s$$

$v$ はリーフディスクウェルの有効体積（mL），$R_1$，$R_2$ は $s$（mL）の大気を入れる前と入れた後の電圧（V）．

## 1.d.2　液相型酸素電極を用いた酸素発生の測定

液相型酸素電極システムは，溶液中の酸素濃度を測定することによって，試料の光合成速度を求められる．光合成速度の測定用試料としてよく用いられるのは，藻類，葉肉細胞プロトプラスト，単離葉緑体，単離チラコイド膜である．酸素電極として通常は，気相型と同様に Clark 型酸素電極を用いるので，測定原理は同じである[3,4]．

反応容器としてはプラスティック製とガラス製がある．プラスティック製の方が壊れにくく扱いやすいが，光合成測定では光を照射し，阻害剤を加える場合もあるので，透明度が高く，阻害剤が吸着しにくいガラス製の方が良い．液相型酸素電極システムは Hansatech 社のシステムと Rank Brothers 社[注9] のシステムがある．Hansatech 社のシステムでは，酸素電極ディスク，制御器は気相型と同じものを使用できるが，Rank Brothers 社のシステムの方が比較的安価である．

### 1.d.2.1　液相型システムの構成

Rank Brothers 社製の液相型の酸素電極システムは図 2 のようである．マグネチックスターラーの上に酸素電極を固定し，水を循環できる反応容器を上に固定する．Rank Brothers 社製のガラス製反応容器は，2.5 mL（OXY051A），6 mL（OXY050A），50 mL（OXY052A）の 3 種類の容量のタイプがある．上下可動のふたがあり，液量が 0.5−2 mL までなら 2.5 mL（OXY051A），3 − 5 mL までなら 6 mL（OXY050A），容量を大きくしたい場合には 50 mL（OXY052A）を用いると良い．酸素電極につなげる制御器は，Rank Brothers 社製ではシグナルを増幅できる制御器[注10] と増幅できない制御器があるが，自作の制御器でも良い．

酸素電極は温度にきわめて敏感に反応するので，反応容器に水を循環するための恒温槽は，精度の高いものが良い．溶液中の酸素の拡散が律速しないように，溶液をスターラーで撹拌する．撹拌したときに電気的ノイズが小さいスターラーバーを選ぶ．

光源は横から照射して光合成反応を進める．光源の照射により反応容器内が暖まってしまう場合には，水フィルターなどを光源と反応容器との間に入れる．クロロフィル蛍光も同時に測定する場合には，Hansatech 社製の液相型酸素電極システム（DW2/2）がファイバーを反応容器に近づけられ，光が散乱しにくい構造なので良い．

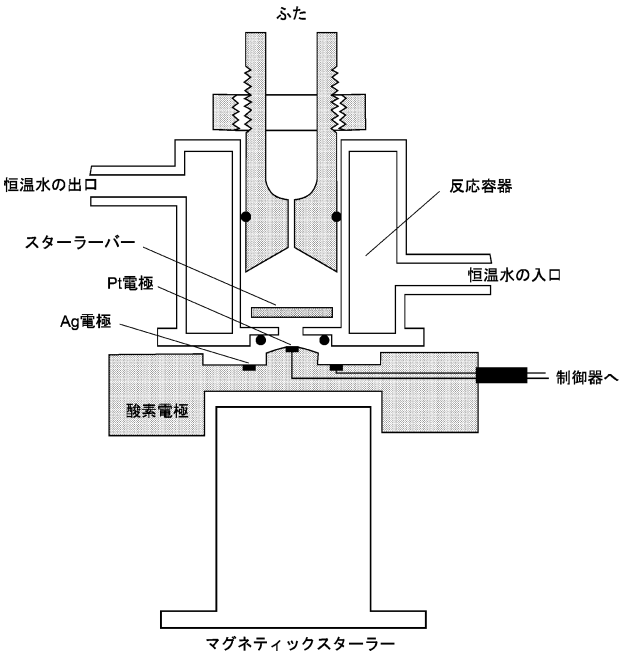



**図 2**：Rank Brothers 社製のガラス製液相型の酸素電極システムの模式図．

### 1.d.2.2　酸素電極の組立てと測定前の注意事項

気相型と異なり，液相型の酸素電極の組立ては測定前日にしておくと測定が安定する．厚いテフロン膜[注11] を用いると，1 週間以上は使用できる．銀電極を磨いた後，タバコ紙（真ん中に穴をあけると良い）とテフロン膜を円形に切り，飽和 KCl 溶液を Pt 電極部に垂らし，O リングで固定する．Ag 電極の凹み部分にも飽和 KCl 溶液を入れると良い．反応容器と酸素電極の台とが密着する部分に真空グリースを塗り，反応容器と酸素電極の台とを固定する．テフロン膜を取り付けた後に酸素電極を使用しないときには，反応容器を蒸留水で満たし，テフロン膜が乾燥しないようにしておく．

恒温槽から反応容器に水を循環させ，温度を一定にしておく．酸素電極の反応容器に蒸留水を半分程度入れ，スターラーを撹拌することで大気を取り込みながら，酸素電極の出力電圧が一定になるまで待つ（通常 10 分程度）．出力電圧がかなり不安定ならテフロン膜を貼り直す．出力電圧が安定したら大気中の酸素と平衡にある水の酸素濃度の出力電圧を読みとる．

---

[注9] 日本では Rank Brothers 社（http://www.rankbrothers.co.uk）製の酸素電極は，株式会社三啓（http://www.sankei-coltd.co.jp）が取り扱っている．

[注10] マグネティックスターラー台とも一体型なのでサイズが大きい（Digital Model 10）．

[注11] 筆者はワイエスアイ・ナノテック株式会社（http://www.nanotech.co.jp/index.html）製の Membrane kit Standard（5775）のテフロン膜を使用している．

**表1**：1気圧の空気と平衡になった蒸留水中の酸素濃度の温度依存性[9]

| 温度（°C） | 0 | 5 | 10 | 15 | 20 | 25 | 30 | 35 | 40 | 45 | 50 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 酸素濃度（$\mu$M） | 442 | 386 | 341 | 305 | 276 | 253 | 235 | 220 | 206 | 192 | 176 |

次に，反応容器にジチオナイトを少量入れ，電極の残留電流（ゼロ補正）と反応速度（感度）を確認する．感度が悪い場合にはテフロン膜を貼り直した方が良い．ジチオナイトを加えた後，ふたを挿入し，ふたの中央の穴に水面が少し上がるように調節する．出力電圧が一定になったときの電圧値を，酸素濃度が0 $\mu$Mの時の出力電圧とする．ジチオナイトを添加する前と後の出力電圧の差が，水の飽和溶存酸素濃度（25°Cなら253 $\mu$M表1参照）に相当する．

反応容器の液を取り替えるときにはアスピレータ（洗ビンの中のチューブを短くしたものでも良い）を用いて液を捨て，蒸留水ですすぐ．エタノールなどに溶かした阻害剤などを加えた場合にはエタノールでもすすいだ方が良い．アスピレータですすぐ際にテフロン膜を傷つけないように注意する．

### 1.d.2.3　酸素発生速度の測定

本章では，葉片，葉肉細胞プロトプラストと単離葉緑体を用いて，酸素発生速度を測定する方法について紹介する．藻類の酸素発生測定については2章4を，単離チラコイド膜の電子伝達活性については4章5を参照してもらいたい．

葉肉細胞プロトプラストや単離葉緑体の酸素発生速度は，2.5 mLもしくは6 mLの反応容器を用いる．6 mLの反応容器の場合には，反応液全量で3−4 mL程度にすると良い．測定に用いる緩衝液はあらかじめ恒温槽に入れて，測定温度に保っておくと良い．酸素は低温ほどより多く溶解する．低温のままの緩衝液を用いると，反応容器内で暖められ気泡が生じてしまう．

適切な緩衝液，測定試料，阻害剤などを反応容器に入れた後，試料室のふたを挿入し，ふたの中央の穴に水面が少し上がるように調節したのち，スターラーを回転させる．ふたをする前にスターラーを回すと，気泡が入りやすい．

測定に用いる緩衝液の例として，葉肉細胞プロトプラストの測定には，0.4 M sorbitol，1 mM $CaCl_2$，1 mM $MgCl_2$，1 mM $NaHCO_3$，10 mM Hepes-KOH（pH 7.5）[5]，単離葉緑体の測定には，0.33 M sorbitol，2 mM EDTA-2K，1 mM $MgCl_2$，1 mM $MnCl_2$，0.5 mM $KH_2PO_4$，5 mM Na pyrophosphate，10 mM $NaHCO_3$，50 mM HEPES-KOH（pH 7.6）[6]が用いられている．プロトプラストや葉緑体の懸濁液は，終濃度が20 mg Chl $L^{-1}$に程度になるように入れる．

暗幕などを用いて暗条件にしておき，酸素電極の出力電圧が安定するのを待つ．安定後に反応容器に光を照射する．2分ほど測定した後に光を消す．記録計の用紙には光をon/offしたところを記入し，暗条件の傾きと照射条件の傾きを求める．この2つの直線の傾きの差から酸素濃度の変化として，酸素発生速度を求める．

葉片の酸素発生測定をするときには，Rank Brothers社製の反応容器をそのまま使用することはできない．自作の反応容器が必要となる．図3はソラマメ葉の裏表皮を剝離して，反応容器のふたの裏に接着し，酸素発生速度とクロロフィル蛍光を同時に測定できる液相型システムの模式図である[6]．酸素電極はRank Brothers社製のものをそのまま用いた．葉片への光照射とクロロフィル蛍光の検出には，Walz社製のPAM101/102/103に付属したファイバーを用いた．反応容器には，10 mLの緩衝液（50 mM HEPES-KOH［pH 7.2］，0.5 mM $CaSO_4$，20 mM $NaHCO_3$）を入れた．あらかじめ葉に緩衝液を減

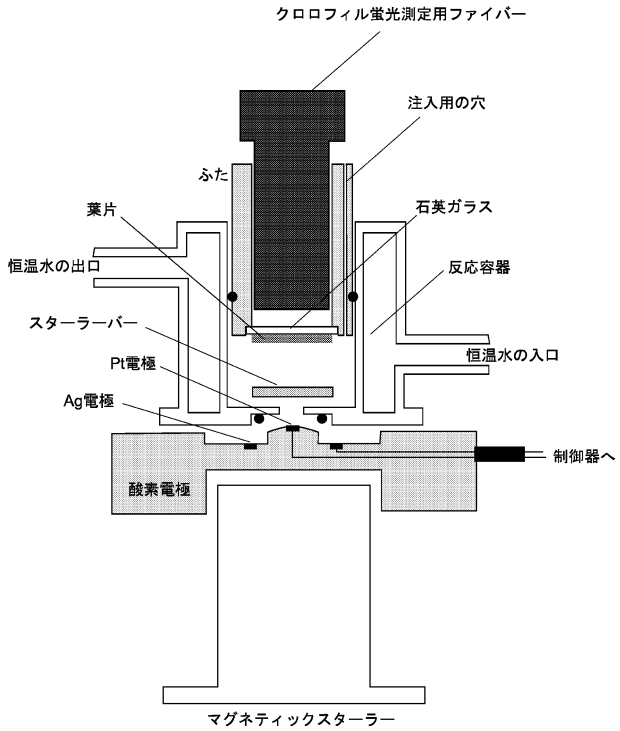



**図3**：葉片の酸素発生速度とクロロフィル蛍光を同時に測定できる液相型システムの模式図[6]．酸素電極はRank Brothers社製の電極を利用している．ソラマメ葉の裏表皮を剝離して，反応容器のふたの裏に接着している．

圧により湿潤させておくと，高い活性が得られる．

### 1.d.3 Clark 型酸素電極以外の酸素濃度センサーを用いた測定

酸素濃度の測定には Clark 型酸素電極以外に，同じポーラログラフ方式の Joliot 型酸素電極や，磁気方式[注12]，ジルコニア方式[注13]，隔膜ガルバニ電池方式[注14]，蛍光光学方式[注15] といった酸素濃度センサーが用いられている．光合成測定には，試料を電極に直接接触させる Joliot 型酸素電極が，フラッシュによる酸素発生の周期振動の測定に使われる．その他のセンサーを光合成研究に用いた例は少ないが，2 つの隔膜ガルバニ電池方式のセンサーの差分電圧を測定できる酸素計[注16] を，開放系ガス交換システムで用いた研究が報告されている[7,8]．

[注12] 酸素の常磁性を利用して酸素濃度を測定する．

[注13] 固体電解質ジルコニア素子が高温で酸素イオンに対して伝導性を示す．ジルコニア素子の両側に Pt 電極をつけて加熱し Pt 電極間に酸素分圧差が生じると，両電極間で酸素イオンが移動し起電力が生じる．この性質を利用して酸素濃度を測定する．

[注14] 電解液を入れた容器内に陽極側を貴金属（Au など），陰極側に卑金属（Pb など）で電極を構成する．陽極側にとりつけたガス透過性の膜（隔膜）を拡散透過してきた酸素量に比例した電流が流れる．電流測定により酸素濃度が測定できる．

[注15] 蛍光染色フィルムからの蛍光エネルギーが周囲の酸素により減少するという性質を利用し，蛍光エネルギーを光学的に測定する．Clark 型酸素電極と比較して高価だが，非常に細いタイプなど様々なセンサーヘッドを利用できる．Presens 社（http://www.presens.de）やオーシャンオプティックス社（http://www.optosirius.co.jp/OceanOptics/index.html）が製造している．

[注16] AEI Technologies 社（http://www.aeitechnologies.com）製の S-3A/DOX や Qubit System 社（http://www.qubitsystems.com）製の S104 Differential Oxygen Analyzer がある．

## 参考文献


1）L. C. Clark Jr., Trans. Amer. Soc. Artif. Inter. Organ **2** (1956) P.41.

2）T. Delieu & D. A. Walker, New Phytol. **89** (1981) P.165.

3）D. A. Walker, The Use of the Oxygen Electrode and Fluorescence Probes in Simple Measurements of Photosynthesis, Sheffield, Robert Hill Institute, 1987.

4）D. A. Walker,「光合成測定」平知明，和田野晃（監修）旭光通商，1995.

5）K. Padmasree & A. S. Raghavendra, Physiol. Plant. **105** (1999) P.546.

6）K. Yoshida, I. Terashima & K. Noguchi, Plant Cell Physiol. **47** (1996) P.22.

7）Y.-P. Cen, D. H. Turpin & D. B. Layzell, Plant Physiol. **126** (2001) P.1555.

8）P. A. Davey, S. Hunt, G. J. Hymus, E. H. DeLucia, B. G. Drake, D. F. Karnosky & S. P. Long, Plant Physiol. **134** (2004) P.520.

9）G. A. Truesdale & A. L. Downing, Nature **173** (1954) P.1236.

# 2．個体から群落スケールの $CO_2$ ガス交換
## a. 同化箱法による器官や個体レベルのガス交換

野田　　響[1)]，村岡　裕由[1)]

本稿では，同化箱（チャンバー）を用いた植物体の器官（葉，茎，根）や個体レベルの $CO_2$ ガス交換速度の測定方法について概説する．これらのデータを植物の生育環境での気象条件と合わせて解析することにより，生育環境での物質生産を推定できる．

## $CO_2$ gas exchange measurements of a whole-plant

Hibiki Noda and Hiroyuki Muraoka

Measurements of photosynthetic and respiratory $CO_2$ exchange responses of leaf, stem and root to environmental regimes such as light and temperature by using a cuvette (chamber) provide us with mechanistic estimation of *in situ* photosynthesis and respiration at whole plant scale, which are crucial to deepen our understanding on the matter economy of plants in their natural habitats.

### 2.a.1　はじめに

同化箱法とは，アクリルやガラス，金属製のケースに植物体を入れて空気を流し，ケースに流入する空気と排出される空気の $CO_2$ 濃度の差から，植物体の $CO_2$ ガス交換（光合成，呼吸）を求める方法である．植物サンプルを覆うケースを同化箱（チャンバー）と呼ぶ．空気の $CO_2$ 濃度は赤外線ガス分析計（Infra Red Gas Analyzer：IRGA）で測る．植物体が光合成をすればチャンバーから排出される空気の $CO_2$ 濃度は低下し，逆に呼吸をすれば $CO_2$ 濃度は上昇する．同化箱法には，閉鎖系システムと開放系システムがある（図1）．多くの場合には，開放系システムが用いられる．開放系システムでは，一定濃度の $CO_2$ を含む空気（リファレンスガス）を送り，チャンバーから排出される空気（サンプルガス）の $CO_2$ 濃度を測定することによって $CO_2$ 濃度の差を検出し，チャンバー内の植物体の光合成速度あるいは呼吸速度を算出する．

同化箱法は，葉や茎，根などの器官や個体レベルの光合成や呼吸速度の環境応答の測定に用いられる．また時には草本群落のガス交換の測定にも適用できる．測定対象は研究目的に応じるが，同化箱法は，特に植物の物質生産や成長の環境応答を定量的に理解する研究において基本的な手法である．同化箱法によって測定した光合成や呼吸速度を，様々な光や温度，水分条件のもとで測定し，さらに生育環境での微気象観測データと照合することによって，生育環境での個体の物質生産の推定が可能となる[1),2)]．また，1年を通じて同化器官と非同化器官の

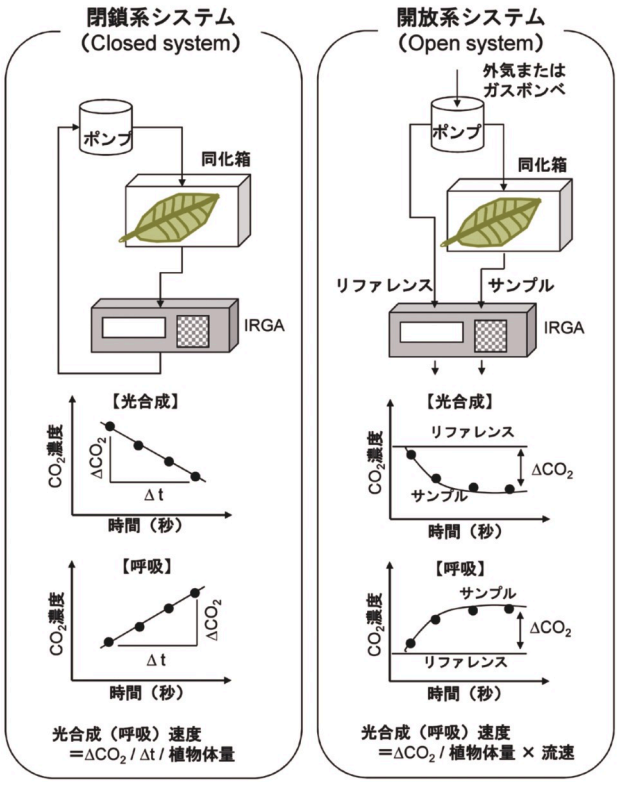



図1：植物の $CO_2$ ガス交換を測るためのシステムの概要．閉鎖系システム（左）では，空気をシステム内で繰り返し循環させながら $CO_2$ 濃度の変化を測定することによって，植物体の呼吸速度（あるいは光合成速度）を求める．開放系システム（右）では，一定濃度の $CO_2$ を含む空気をチャンバーに通気し続け，チャンバーから放出される空気の $CO_2$ 濃度との差から呼吸速度（あるいは光合成速度）を求める．

1）岐阜大学　流域圏科学研究センター

光合成および呼吸活性を測定することによって，光合成や呼吸のフェノロジーと個体の物質経済について実験的に推定することもできる[3]．

近年，個葉の光合成や呼吸速度は，開放系システムである携帯型の光合成測定装置（Li-Cor 社の LI-6400，Heinz-Watz 社の GFS-3000，CID 社の CI-340 など）を用いて測定されることが多くなっている．これらの機器は光強度や温度，湿度，$CO_2$ 濃度の制御が可能であり，個葉の $CO_2$ ガス交換反応を実験室内でも野外でも比較的簡便に測定できる[4]．一方で，これらの携帯型測定機器が備えるチャンバーは小さく，測定対象の葉の一部しか測れないため，気孔開度の不均一性や，葉内の $CO_2$ 拡散の不均一性を考慮した測定を行うためには，一枚の葉を十分に覆うことのできるチャンバーを備えた開放系システムの構築と適用が有効である．本章では，まず個葉の $CO_2$ ガス交換（光合成，呼吸）の測定方法について概説し，次に葉以外の器官や個体全体の呼吸速度の測定方法について述べる．

## 2.a.2　個葉の光合成および呼吸測定システム

個葉の光合成速度を測定するためには，光合成速度の制限要因である光（光合成有効放射）や温度，湿度，$CO_2$ 濃度（光合成速度の決まる仕組みについては 1a 章を参照）を制御できるシステムを構築する．現在市販されている携帯型光合成蒸散測定装置のほとんどはこれらの機能を備えている．しかしこれらの機器では測定が個葉の一部分に限られたり，あるいは測定温度範囲が限定的な場合がある．その場合には測定システムの自作が薦められる．図 2 に一般的な個葉ガス交換測定システムの概略を示す．このシステムは，一般的な開放系システムと同様に，①チャンバーに空気を送り込む送風系，②チャンバーとその内部環境を制御する装置を含む同化箱系，③試料（サンプル）空気の $CO_2$ 濃度を測定する分析系，から成る．以下，それぞれについて概説する．

### 2.a.2.1　送風系

光合成速度の測定は，一定の $CO_2$ 濃度と湿度（水蒸気濃度），温度条件を備えた空気を葉に供給することによって実現する．したがって送風系では，$CO_2$ 濃度，湿度，温度の制御がシステムの要である．測定に用いる空気の $CO_2$ 濃度は，$CO_2$ を含まない標準ガス（窒素と酸素の混合）と高濃度 $CO_2$ ガスを混合することによって調整する．混合された空気はコックなどを用いて 2 系統に分け，一方はリファレンスガスとして IRGA（図 2 の IRGA-1）に送り，他方はサンプルガスとしてチャンバーに送られる．

同化箱に送られる空気は水を入れたガラス瓶を通して予め加湿する．この加湿用ガラス瓶での空気のリークが生じないように密閉性に留意する．加湿用ガラス瓶に空気を導入するチューブは瓶内の水に漬け，加湿後の空気を瓶から出すチューブは水に漬けないように十分注意する．チャンバーに送られる空気の温度制御のために，加湿用ガラス瓶は恒温水循環装置（タイテック株式会社のクールニットなど）を着けた恒温水槽に浸すとよい．

加湿された空気の温度と湿度を温湿度計（例えば，ヴァイサラ社の HMP35A）で測定し，再び流量計で流量を確

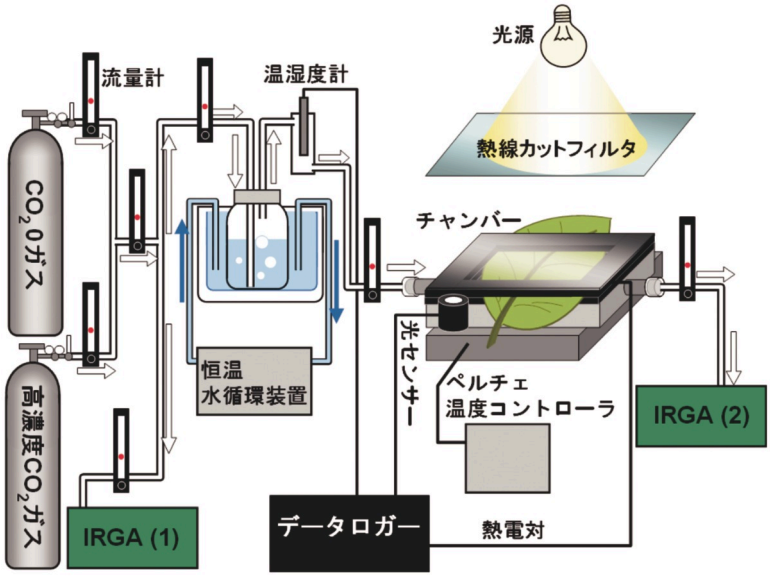



図 2：個葉の光合成および暗呼吸速度，蒸散速度を測定する開放系システムの概略図．

認しチャンバーに送る．チャンバーへの流量は，チャンバーの容量に合わせて決めるが，概ね 0.5〜1.0 l/min 程度である．チャンバーで空気のリークが生じることと，測定に用いる IRGA が適切なガス分析に要する最小流量（0.5 l/min 程度）を考慮する．また流量が小さいと葉の境界層が発達して十分なガス交換が得られないため，チャンバーにファンを入れない場合には，流量が多い方が良い．一方で流量が多すぎると速度の低いガス交換を検知しにくくなるという問題も生じる．

### 2.a.2.2　チャンバーとその環境制御

チャンバーは，アクリルやガラス製の無色透明な窓の付いた上蓋（チャンバー上部）と，金属製の底面を持つ箱状の部品（チャンバー下部）から成る（図 3）．チャンバーの容量を大きくする場合には，葉面の境界層を薄くするためにチャンバー内にファンをつける．チャンバーの上部と下部の間に測定対象とする葉を挟む．このとき，

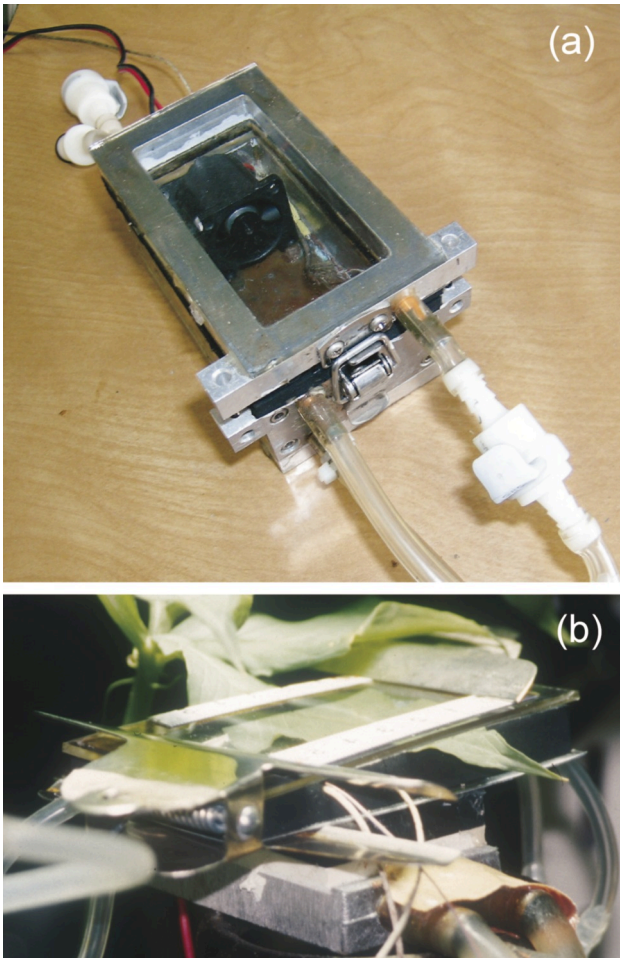



**図 3**：個葉のガス交換測定に用いるチャンバーの写真．容積が大きいためにファンを備えたもの（a）と，チャンバー内積を薄くしてファンを不要にしたもの（b）．（写真：a，彦坂幸毅氏，b，筆者）．

チャンバーと葉の隙間からの空気のリークと葉の損傷を防ぐために，密封性が高く，かつ柔らかい素材で枕をつける．ウェットスーツの生地が最も適している．

チャンバー内には，葉温と気温を測定するための熱電対を 1 本ずつ挿入する．これらの熱電対はデータロガーに接続する．

チャンバーの温度は，サーモモジュールによって行う．チャンバーの下部を金属製とし，サーモモジュールに直接取り付けることによって，効率よく温度制御をすることができる．ただし過度な冷却はチャンバー内での結露を生じるため，低温での測定を行う場合にはチャンバーに送る空気の温度を事前に下げることや，実験室温の制御を同時に行うことが有効である．

光合成速度の測定に供する光は，陽光ランプ（メタルハライドランプ）から得る．陽光ランプの光は熱を持つため，熱線カット用ガラスフィルタを用いて熱を遮断する．または，ハロゲンランプを用いた冷却装置付きの光源装置を用いる．チャンバーに照射する光強度の調節は，光質を変化させない寒冷紗（黒色あるいは白色）によって行う．葉の暗呼吸速度の測定を行う場合には，チャンバー全体を黒色の布などで完全に覆う．

### 2.a.2.3　分析系

チャンバーから出る空気（サンプルガス）は流量計を通して流量の確認を行い，IRGA に導入する（図 2 の IRGA-2）．チャンバーの前後で流量に大きな差がある場合には，チャンバーの密封性を上げる工夫を施す．

### 2.a.2.4　光合成速度の計算

光合成速度や暗呼吸速度の計算は，チャンバーに送られる空気の流量（F），2 つの IRGA で測定する $CO_2$ 濃度（$CO_{2ref}$ と $CO_{2sample}$），チャンバー内の葉面積（$L$），光合成速度と同時に測定される蒸散速度（$E$）の値を用いて行う．

開放系システムにおけるマスバランスは次式によって表される．

$$L \times A = F_{in} \times CO_{2in} - F_{out} \times CO_{2out} \qquad (1)$$

ここで $L$ はチャンバー内の葉面積，$A$ は求める光合成速度，$F_{in}$ はチャンバーに入るときの空気の流量（mol $s^{-1}$），$F_{out}$ はチャンバーから出る空気の流量である．また $CO_{2in}$ と $CO_{2out}$ はそれぞれチャンバーに入る空気の $CO_2$ 濃度（$\mu$mol $mol^{-1}$）とチャンバーから出る空気の $CO_2$ 濃度であり，前者は $CO_{2ref}$ と等しく，後者は $CO_{2sample}$ と等しい．流量計で測られる流量の単位は多くの場合は［l/min］であるため，理想気体の状態方程式を用いてモル量に変換する[5]．

チャンバーにリークが全く無ければ，チャンバーから出る空気の流量 $F_{out}$ は，

$$F_{out}=F_{in}+L\times E \qquad (2)$$

となる．式（2）を式（1）に代入して整理すると次式を得る．

$$A=\frac{F_{in}(CO_{2in}-CO_{2out})}{L}-E\times CO_{2out} \qquad (3)$$

蒸散速度（$E$）の計算方法については，3章を参照されたい．

## 2.a.3　植物体の呼吸測定システム

筆者らは草本や小型の稚樹の器官（葉，茎，根）や個体の呼吸速度の温度依存性を測定することを目的として，開放系のガス交換測定システムを使用している（図4）．呼吸速度は温度の影響を最も強く受けるため，測定時のチャンバー内の温度環境の制御が必要である．このシステムでは，チャンバーを水槽に沈め，水槽内の水温を恒温水循環装置を用いて調整することによってチャンバー内の温度を制御する．呼吸測定システムでも，上記の個葉ガス交換測定システムと同様に，①送風系，②同化箱系，③分析系，から成る．

### 2.a.3.1　送風系

筆者らは測定に供する空気は，一定濃度の $CO_2$ を含むエアバランス（窒素，酸素，$CO_2$ の混合）ガスボンベから得ることが多い．ガスボンベではなく外気を用いる場合には，空気の $CO_2$ 濃度を可能な限り安定させるために，数 $m^3$ のビニル製のバルーンか大型のポリタンクにエアポンプで外気を導入し，そこから小型のポンプでガス交換システムに送風する．送風される空気の $CO_2$ 濃度は常に測定される必要がある．

チャンバーへの送風量は流量計やマスフローコントローラーで調節する．流量は，チャンバーのサイズや植物試料の呼吸活性にもよるが，概ね 0.5〜1.0 l/min 程度である．呼吸活性が低い試料に対して流量を大きくすると，$CO_2$ 濃度の差を検出しにくくなるため，測定条件や試料の状態に応じた調節を必要とする．

チャンバーに送る空気の温度と湿度も，温湿度計を用いて測定する．温湿度計はデータロガーに接続し，チャンバー内の温度とともに記録する．

### 2.a.3.2　植物試料（サンプル），チャンバーとその環境制御

筆者らが呼吸を測定する際には，適当な長さ（30 cm 程度）に切断した金属パイプの両端をゴム栓でふさいだものをチャンバーとして用いた．金属は温度の伝わりが良く，水に沈むので水槽に沈めるための工夫（重りをつけるなど）の必要がない．金属パイプの両端にはめるゴム栓にはコルクボーラーで穴を開け，チャンバーへの空気の供給（入口）と排出（出口）のそれぞれのためのチューブと，チャンバー内の温度を測定するための銅―コンスタンタンの熱電対を通した．

チャンバーの温度制御には，大型のプラスティック製コンテナと恒温水循環装置を用いている．コンテナに水を入れて水槽とし，チャンバーを水槽に沈め，水温を恒温水循環装置によって制御することにより，チャンバー

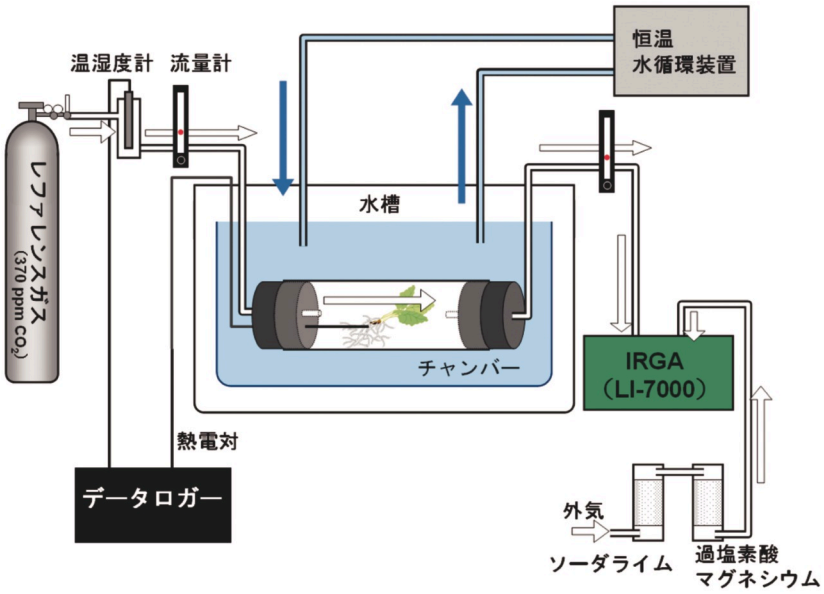



図4：植物体の呼吸速度を測定する開放系システムの概略図．

内の植物試料の温度を調節する．呼吸速度の温度依存性の測定には，概ね，5～40℃での制御ができることが望ましい．水槽の水温を変える際には，恒温水循環装置だけに頼らずに，水槽に湯や氷を入れると時間の節約になる．

チャンバー内には熱電対を導入して，その先端を医療用の紙絆創膏などを用いて植物体に軽く止め，植物体の温度をモニタリングする．熱電対はデータロガーに接続し，記録する．

植物試料をチャンバーに入れる際には，測定中の乾燥を防ぐために濡れたキッチンペーパーで包む．さらにこれを目の粗く柔らかい金属製の網で軽く覆うことにより，植物体サンプルやキッチンペーパーがチャンバーの内壁に密着することを防ぐ．これによりチャンバー内の空気の循環がスムーズになるため，測定誤差を小さくすることができる．

### 2.a.3.3　分析系

チャンバーから排出される空気の $CO_2$ 濃度は，赤外線ガス分析計（IRGA）で分析する．このシステムでは，LI-7000（Li-Cor 社）を使用している．LI-7000 は二つの IRGA のセルを持つ．最も安定した測定を行うためには，一方のセルにはサンプルガス（チャンバーから排出される空気）を，他方のセルには $CO_2$ および $H_2O$ の濃度が一定のガスを流し，二つのセルに流れる空気の $CO_2$ 濃度差からサンプルガスの $CO_2$ 濃度を測定する方法を採ると良い．筆者らのシステムでは，ポンプで引いた外気をソーダライム，および過塩素酸マグネシウムの入った容器を通して $CO_2$，$H_2O$ を取り除き，その空気を分析時の基準濃度とした．

IRGA に水が入ると故障の原因になる．もし，測定の際にチャンバーから IRGA の間のチューブ内部に水滴が多量に着く場合には，チャンバーと IRGA の間に過塩素酸マグネシウムを入れた容器，あるいは冷却式エアードライヤーを着けてガスを通し，水分を取り除いた後に，IRGA にサンプルガスを送る．IRGA に送られる空気の流量は，流量計を用いてモニタリングする．

多くの IRGA には，測定値をデータロガーに出力するための外部接続端子が備えられているので，測定値はデータロガーに記録する．

### 2.a.3.4　測定中のその他の注意

呼吸による $CO_2$ 濃度の変化は光合成による変化に比べて非常に低いことから，測定値のわずかな誤差が測定結果に大きく影響する．そのため，1～2 時間ごとに IRGA の較正を行う．また，チャンバーにサンプルが入っていなくても，サンプルを包むキッチンペーパーが含む水分やチューブ内の結露は $CO_2$ を吸収してしまう．植物体サンプルが小さかったり，呼吸活性が低いサンプルの場合には，この吸収量は無視できない．そこで，測定の際にはサンプルをチャンバーに入れずに測定時と同じ条件（室温，水温，ガスの流量）で標準ガスを流した際の $CO_2$ 濃度の変化も測定しておき，サンプルの呼吸以外の要因による $CO_2$ 濃度の変化量を把握しておく．

チャンバー内の植物体の呼吸活性以外の要因が $CO_2$ 濃度の変化にもたらす影響を検出しやすくするためには，チャンバーを複数（2～4 個）用意し，このとき少なくとも一つのチャンバーには植物試料を入れず，他と同様に湿らせたキッチンペーパーを入れて，並行して測定する方法がある．測定中にはこれらのチャンバーすべての同量の空気を流す．チャンバーから出るチューブは，それぞれ「三方コック」に接続する．各チャンバーの $CO_2$ 濃度を測定する際には，このコックを操作して IRGA に空気が送られるようにする．

室温とチャンバー内の設定温度によっては，チューブ内の結露は避けられないが，チューブ内に結露で水分が貯まってしまわないようにしなければいけない．そこで，結露したチューブは，ひとつの条件での測定を終える度に取り外し，エアポンプで外気を流して乾燥させるなどの工夫が必要である．

### 2.a.3.5　呼吸速度の計算

植物体の呼吸速度（$R$）は，以下の式で求められる．

$$R = F \times \Delta CO_2 \div M \qquad (4)$$

ここで，$F$ はチャンバーへ送る空気の流量（mol $s^{-1}$），$\Delta CO_2$ はチャンバーに送る空気とチャンバーから出る空気の $CO_2$ 濃度の差（$\mu$mol $mol^{-1}$），$M$ は植物体量（葉面積，乾燥重量）である．流量計で測られる流量の単位は多くの場合は [l/min] であるため，理想気体の状態方程式を用いてモル量に変換する[5]．

植物体の器官の呼吸速度を測定する際には，個体から切り離すことになる．しかし植物は傷害を受けると呼吸速度が上昇する[6),7]．そのため，筆者らは小型の多年生草本（サクラソウ *Primula sieboldii*）を材料として，以下の手順によって，測定された呼吸速度から傷害よる呼吸が占める割合を求めて，呼吸速度の測定値を補正した[3]．

$$R_A = OR_A - (OR_A + OR_B - R_{IR}) \times \frac{OR_A}{OR_A + OR_B} \qquad (5)$$

$$R_B = OR_B - (OR_A + OR_B - R_{IR}) \times \frac{OR_B}{OR_A + OR_B} \qquad (6)$$

1）Intact な状態で植物個体全体の呼吸速度（$=R_{IR}$）を測定する．

2）サンプル個体を地上部(葉と葉柄)および地下部(根)に切り分ける．カミソリで切り分け，乾燥を防ぐために切り口にワセリンを塗る．植物体の切り分け方は，材料とする植物の形態に応じる．
3）それぞれ，見かけ上の地上部の呼吸速度(＝$OR_A$)と地下部の呼吸速度(＝$OR_B$)を測定する．この値には傷害による呼吸速度も含まれるため，サクラソウの場合には $OR_A$ と $OR_B$ の合計は $R_{IR}$ より40%程度高くなっていた．
4）見かけ上の呼吸速度は，それぞれ同じ割合で傷害による呼吸速度を含んでいると仮定し，実際の呼吸速度（＝$OR_A$，$OR_B$）を推定した．

大型の植物体の一部を切り出して測定を行う場合には，試料を乾燥させないように保存状態に留意しながら，呼吸速度の時間経過を事前に把握しておくとよい[8]．

## 2.a.4　その他の測定例

開放系のガス交換測定システムを自作することの最大のメリットは，チャンバーのサイズや計上の自由度の高さにある．すなわち，研究対象とする植物体の構造やサイズに応じてチャンバーを工夫することにより，比較的自由に研究を実行できる．例えば筆者らは，やはり小型の多年生草本（カワラノギク *Aster kantoensis*）の個体を納めることのできるチャンバーを開発し（図5），地上部（葉，茎）と地下部（根）のそれぞれの光合成と呼吸速度を別々に，そして同時に測定した[2]．植物の地下部はプラスティック製のポットに入れた砂（微生物呼吸の影響を消すために，よく洗浄し，陽に乾した）に植えた状態で測定を行った．ただしこのチャンバーでは，チャンバー上部と下部の間で $CO_2$ の行き来がないように，パテで茎の周辺を密閉するなどの注意深い準備が必要である．さらに筆者らはこのチャンバー全体の密閉度を完全なものとして，先の要領で水槽に沈めて植物体全体の温度を制御することにより，光合成速度と呼吸速度の温度依存性を測定することができた．このようなチャンバーを使うことにより，植物体の地上部と地下部の光合成・呼吸活性の相互関係を調べることが可能になるだろう．なお葉の光合成速度を開放系システムで測定する際には，気孔閉鎖を防ぐために，チャンバーに流す空気の湿度を適切に管理する必要がある．チャンバーに流入する空気と排出される空気の相対湿度を温湿度計で常にモニタリングする．気孔コンダクタンスや蒸散速度は，これらの測定値とチャンバー内の葉温，空気の流量から計算する[5]．また光合成測定時には，人工光源(メタルハライドランプなど）を用意する．光源はチャンバーの上方に固定し，熱線を除去するガラスフィルタを間に設置する．葉に照射する光量の調節は寒冷紗などを用いる．

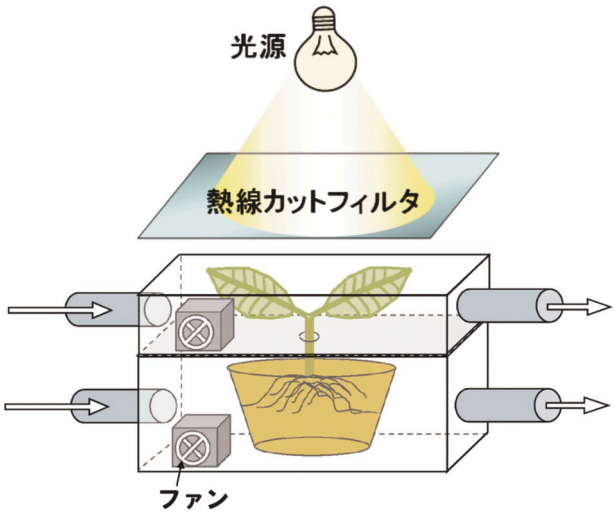



**図5**：開放系システムを用いて，植物個体の地上部（葉）と地下部（根）のそれぞれの $CO_2$ ガス交換速度を同時に測定する場合のチャンバー．このチャンバーを図2で示した水槽に沈めることによって，測定試料の温度制御を行う．

植物個体の $CO_2$ ガス交換の測定だけでなく，開放系システムを利用して，植物群落の $CO_2$ ガス交換を測定することも可能である．ただしこのようなシステムでは，流量を大きくすること，チャンバー内の空気の撹拌を十分に行うことが，信頼性の高い測定に必要である．筆者らは携帯型光合成測定装置（LI-6400）に自ら設計したアクリル製チャンバーを接続することにより，高緯度北極ツンドラ生態系において，小面積の群落の光合成と呼吸速度，すなわち生態系純生産量と生態系呼吸量の測定を試みている[9]．

本稿で紹介した機器のメーカーおよび日本代理店の情報は以下の通りである．

タイテック株式会社
　　http://www.taitec.ne.jp/index.html
Li-Cor 社　http://www.licor.com/
（日本総代理店　メイワフォーシス株式会社
　　http://www.meiwafosis.com/index-1.htm）
CID　　http://www.cid-inc.com/index.html
（日本代理店　ナモト貿易株式会社
　　http://www.namoto.com/）
Heinz Walz GmbH　http://www.walz.com/
（日本代理店　ナモト貿易株式会社
　　http://www.namoto.com/）

ヴァイサラ http://www.vaisala.co.jp/

## 文献


1）D. Sims, R. W. Pearcy, Plant, Cell and Environ. **17** (1994), p.881

2）J. Matsumoto, H. Muraoka & I. Washitani, Annals of Botany **86** (2000) p.787

3）H. Noda, H. Muraoka, Y. Tang & I. Washitani, Journal of Plant Research **120** (2007) p.375

4）村岡裕由,「光と水と植物のかたち　植物生理生態学入門」, 文一総合出版, 2003, p.229

5）C. B. Field, J. T. Ball & J. A. Berry, Plant Physiological Ecology -field methods and instruction-, ed. R. W. Pearcy, J. Ehleringer, H. A. Mooney & P. W. Rundel, Chapman & Hall, p.209

6）T. B. Kinraide, L. F. Marek, Plant Physiol. **65** (1980), p. 409

7）L. Wadso, F. Gomez, I. Sjoholm, P. Roccuki, Thermochim Acta **422** (2004), p.89

8）T. Nakatsubo, Y. Bekku, A. Kume & H. Koizumi, Polar Research **17** (1998), p.53

9）H. Muraoka, M. Uchida, M. Mishio, T. Nakatsubo, H. Kanda & H. Koizumi, Canadian Journal of Botany **80** (2002) p.1193

# 2．個体から群落スケールの $CO_2$ ガス交換
## b．群落の物質生産
### b-1．草本群落の生産構造と群落光合成モデル

及川　真平[1)]

群落の構造（器官のサイズや位置）は群落内の環境（特に光強度）に強い影響を及ぼし，よって群落の生産を規定している．一方で，群落の構造は生産の影響を受ける．本稿では，こうした植物群落の構造と群落内部の光環境の関係を解析する手法を概説する．

## Structure of herbaceous plant stands and canopy photosynthesis models

Shimpei Oikawa

Canopy photosynthesis models are useful to analyze photosynthetic processes in a plant stand on physical and physiological bases. Development of those models are reviewed with particular emphasis on light and nitrogen use.

### 2.b-1.1　はじめに

草本群落の生産の中心は，葉が行う光合成である．葉の光合成速度は，葉をとりまく環境によって規定される．なかでも光は群落内で最も大きく変動する環境要因である．群落に降り注いだ光は群落の内部で大きく減衰する．群落内の光強度の分布は，その群落の構造，例えば葉や枝の位置，大きさや形，それらが向いている方向などの影響を受ける．さらに太陽は季節変化，日変化し，それに伴い群落内の光の分布は時々刻々と変化する．それゆえ，群落内の光分布を知ることは容易ではない．この節では，群落の構造と群落内の光分布の関係，そして群落光合成速度を推定する数学モデルについて概説する．

### 2.b-1.2　草本群落の構造と光合成生産

#### 2.b-1.2.1　草本群落の生産構造

群落内部の光の分布は，群落がもつ葉の量と配置の仕方によって決まる．葉の傾斜角が水平（地面と平行）のとき，群落の最上部に着いている葉は強い光を受け取ることができるが，群落内部の葉はわずかな光しか受け取れない．一方，葉が傾斜していると，光は群落の内部まで射し込むことができ，多くの葉にまんべんなく光が行きわたる．そのため，水平な葉をもつよりも，傾斜した葉をもつほうが，群落全体の生産は大きい．先に述べられているように，水平に置かれた１枚の葉の光合成速度は，光強度とともに増加しやがて飽和する．すなわち，葉は受ける光の量が極度に多い場合，その全てを使い切ることができない．一方，群落内には複数の葉が存在しており，適度な強さの光が全ての葉にまんべんなく行き渡る場合，光合成速度は光強度の増加とともに飽和せず，直線的に増加する（図1）．少数の葉にのみ強い光が当たるよりも，多数の葉に適度な強さの光がいきわたるほうが，群落の光合成速度は高くなるのである．このように，群落の光合成速度の決定においては，群落内の光の分布が重要な役割を果たしている[1)]．

群落の構造と群落内の光の分布，そして光合成の関係

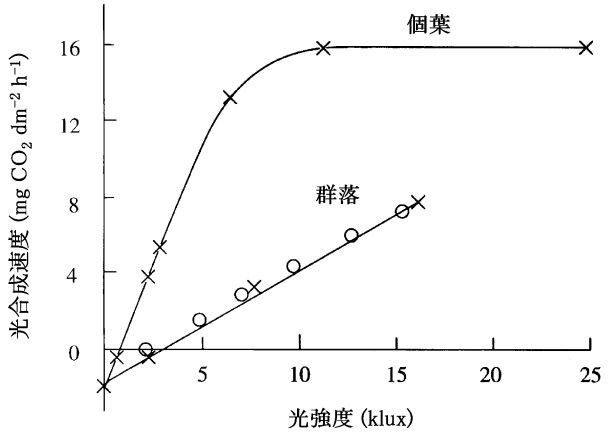



図1：シロガラシの個葉の光―光合成関係と，群落の光―光合成関係（×）．○は M. Monsi と T. Saeki[2)] の群落光合成モデルによる推定値を示す．P. Boysen Jensen[1)] を改変．

1）日本学術振興会　特別研究員

を解析する強力なツールが，M. Monsi と T. Saeki[2] によって考案された「層別刈り取り法」である．彼らは，植物群落を垂直方向に一定の厚さで層状に刈り取り，光合成器官（葉）と非光合成系器官（茎や葉柄，繁殖器官など）の生重，乾重および葉面積の垂直分布を測定した（図 2）．併せて，器官の生重（あるいは乾重，葉面積）と群落内の相対光強度（群落上の光強度を 1 としたときの相対値）の対応を示し，この図を「生産構造図」と呼んだ．広葉型草本の群落では，群落上層に葉が多く，この層で相対光強度が急激に低下する．イネ科型草本の群落では，群落下層に葉が多い．イネ科型草本の葉は広葉型草本の葉に比べてより垂直に近い傾斜角を持ち，光が群落の下層まで行き渡るためであろう．このように，生産構造図を使うことによって，群落内の光の垂直分布が，葉の量やその分布によって決定されていることが分かる．層別刈り取り法の重要なポイントは，植物を葉とそれ以外の器官に分けたことである．それらを分けずに重量を測定すると，後者（とくに茎）の重量が大きいため，しばしば光と葉の分布の関係は明瞭でなくなる．

### 2.b-1.2.2　群落内部の光分布

M. Monsi と T. Saeki[2] は，群落内部の光の減衰と葉の量の測定結果に基づき，両者の関係が，均質な溶液中を透過する光の減衰とよく似ており，Lambert-Beer の法則で近似できることを示した．

$$I_i = I_0 \exp(-KF_i) \qquad \text{式(1)}$$

$I_i$ は群落内のある層 i における水平面の光強度（単位時間あたり単位葉面積あたりの光量子束密度），$I_0$ は群落上における水平面の光強度，$K$ は吸光係数，$F_i$ は群落上から層 i までの葉面積指数（単位土地面積あたりの葉面積，LAI）の合計（積算 LAI と呼ぶ）である．$F_i$ は，群落上で 0，最下層部で最大となり群落の LAI と同じ値となる．層 i における相対光強度（$I_i/I_0$）の対数と $F_i$ は直線関係となり，その勾配が $K$ である（図 3）．

$K$ は，その値が大きいほど群落内部の光減衰が急であることを意味する．太陽光が群落の真上から降り注ぐ場合，水平に展開する葉は垂直方向に傾いた葉に比べて多くの光を受け取るため，葉の傾斜角が低い（＝水平に近

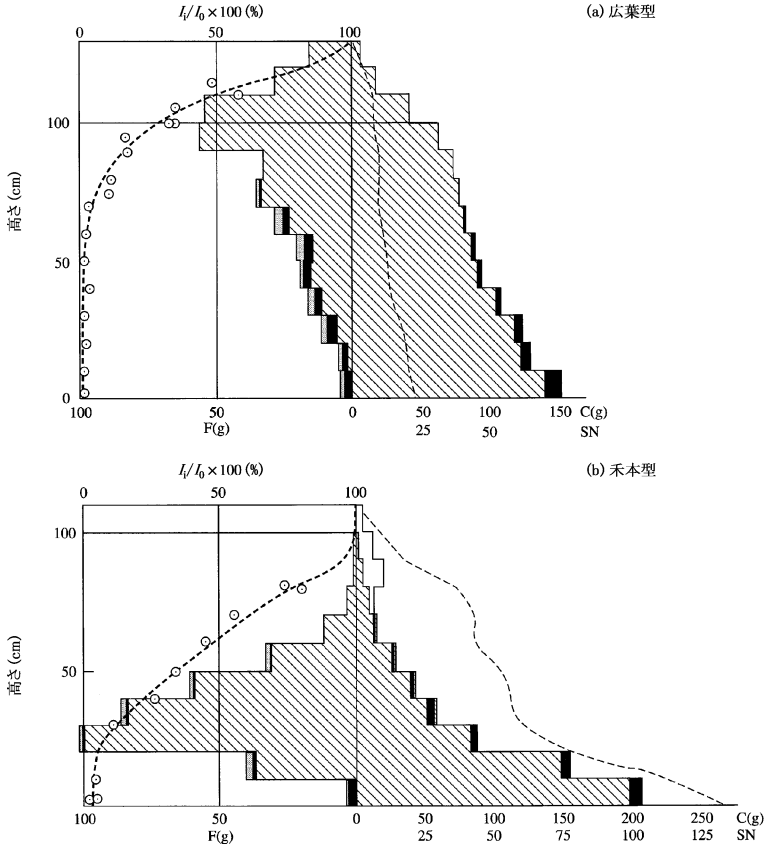



**図 2**：広葉型群落（a；アカザ群落）と禾本型群落（b；チカラシバ群落）の生産構造図．F は，50 cm×50 cm 区画内の同化器官（葉）の生重，C は非同化器官の生重を示す．太い破線は群落内の相対照度（$I_i/I_0 \times 100$），細い破線は 50 cm×50 cm 区画内の茎の数（SN）を示す．斜線部は優占種，白色部は亜優占種，黒色はその他の植物を示す．M. Monsi と T. Saeki[2] を改変．相対照度と相対光強度は互いによく似た値を示すが，厳密には同じではない．詳細は村岡[49] を参照．

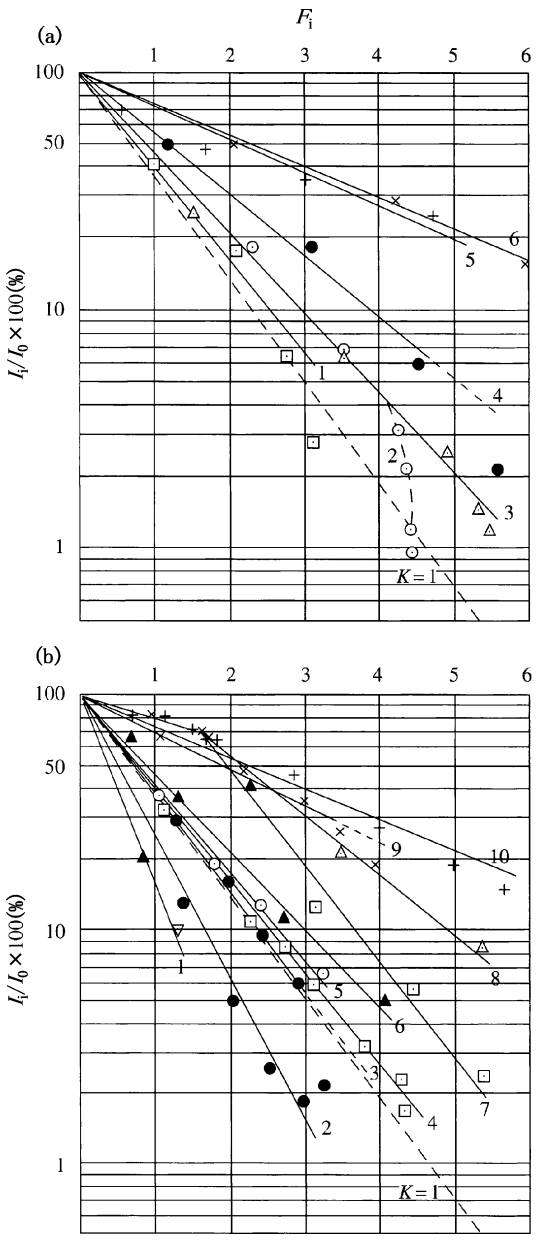



**図3**：(a)霧ヶ峰山地草原の群落における，相対照度（$I_i/I_0\times100$）と積算葉面積指数（$F_i$）の関係．回帰直線の傾きが吸光係数($K$)を示す．直線に付記された数字は，種を示している，1：ミヤコザサ—ワラビ群落（1949年9月15日），2：ミヤコザサ群（1951年8月29日），3：ミヤコザサ群落（1949年9月14日），4：ミヤコザサ群落(1949年8月7日)，5：ススキ群落（1949年9月15日），6：ススキ群落（1949年7月6日）．(b) 1：キカラスウリ群落（1949年9月30日），2：フキ群落（1950年4月28日），3：アカザ群落（1949年6月28日），4：ノウルシ群落(1951年5月5日)，5：キクイモ群落（1949年5月26日），6：キャラボク群落（1949年6月13日），7：オギ—ノウルシ群落(1950年4月30日)，8：ヨシ—ナガボノシロワレモコウ群落(1949年6月3日)，9：オギ群落(1949年6月15日)，10：ヨシ—ノカラマツ群落(1949年7月27日)．M. Monsi と T. Saeki[2] を改変．

い)ほど群落の $K$ は高くなる．例えば，広葉型草本の群落では $K=0.7$〜$1.0$，イネ科型草本の群落では $K=0.3$〜$0.5$ 程度である[2]．

### 2.b-1.2.3　群落光合成速度の推定

層 i の葉が吸収する光の強さ（$I_{L,i}$）は，$I_i$ を $F$ について微分することで得られる．

$$I_{L,i}=\frac{I_0K}{1-t_L}\exp(-KF_i) \qquad \text{式(2)}$$

$t_L$ は葉の光透過率である[3]．

M. Monsi と T. Saeki[2] は，葉の単位葉面積あたりの光合成速度（$p_{N,i}$）を，葉が受ける光の強さ（$I_{L,i}$）の関数として求めた．

$$p_{N,i}=\frac{bI_{L,i}}{1+aI_{L,i}}-r_D \qquad \text{式(3)}$$

$a$ と $b$ は定数，$r_D$ は暗呼吸速度である．$b/a$ は光飽和光合成速度，$b$ は光—光合成曲線の初期勾配を意味する．式(2)を式(3)に代入して得られた $p_{N,i}$ を $F$ について積分することで，群落の光合成速度が得られる．P. Boysen Jensen[1] がシロガラシ群落とオートムギ群落で実測した群落光合成速度は，このモデルで推定したそれとよく一致しており（図1），モデルによる推定が妥当であることが示された．

### 2.b-1.2.4　Monsi & Saeki モデルの問題点

M. Monsi と T. Saeki[2] の群落光合成モデルは非常に単純化された推定法であり，著者自身も指摘しているように重要な単純化が2つある．ひとつは，群落内の全ての葉が同じ生理的特性（$a$，$b$，$r_D$）をもつという仮定である．実際には，群落下層にある葉ほど光合成能力（飽和光下における光合成速度)は低く，同じ量の光が当たった場合でも達成される光合成速度は異なる[4,5,6]．もうひとつの単純化は，群落に降り注ぐ光は全て散乱光であると仮定していることである．晴天日には，太陽の方向からほぼ完全な平行光線（直達光）が群落や地表に到達する．以下に，これらの仮定が群落光合成の推定にどのような影響を及ぼすのか，そしてそれらはどのように克服されてきたのかを述べる．

## 2.b-1.3　窒素分布と群落光合成

### 2.b-1.3.1　群落内部の窒素の分布

群落内の葉は同じ生理的特性をもつわけではなく，強い光が当たる場所に着いている葉の光合成能力は高い．全ての葉の光合成能力が同じではない理由について，H. A. Mooney と S. L. Gulmon[7] は以下のように説明している．葉の光合成能力と窒素含量の間には強い正の相関

がある[8]．これは，葉がもつ窒素の半分以上が光合成系の酵素タンパク質に含まれるためである[9,10]．それゆえ，葉の酵素タンパク質含量を高くすれば，光合成能力を高くすることができる．しかし，同時に，酵素タンパク質を合成，維持するにはコストがかかる．光が十分に当たっている葉では，コストに見合った利益すなわち高い光合成速度を実現できるが，群落下層など，光が光合成の律速要因になる場所では，たとえ葉が多量の窒素をもっていても高い光合成速度を実現できない．そのため，明るい場所に着いている葉ほど高い窒素含量と高い光合成能力をもつというように，群落内には葉窒素含量と光合成能力の勾配ができる．C. B. Field[11] はこのアイデアに基づいて，ある量の窒素をもつ群落の炭素獲得が最大となるときの，葉間の窒素勾配を以下の式で表した．

$$\frac{\delta p_{\mathrm{day}}}{\delta n_{\mathrm{L}}}=\lambda \qquad \text{式(4)}$$

$p_{\mathrm{day}}$ は個葉の日炭素獲得量，$n_{\mathrm{L}}$ は葉面積あたりの窒素含量，$\lambda$ は定数である．この式は，$n_{\mathrm{L}}$ の変化に伴う $p_{\mathrm{day}}$ の変化が群落内の全ての葉で同じになるときに，群落の光合成速度が最大となることを意味している．

### 2.b-1.3.2　窒素分布を考慮した群落光合成モデル

T. Hirose と M. J. A. Werger[12] は，群落内の窒素含量そして光合成速度の勾配を群落光合成モデルに組み込んだ．彼らはまず，葉が受け取る光の強さと光合成速度の関係を，非直角双曲線で近似した．M. Monsi と T. Saeki[2] では直角双曲線が用いられていたが，非直角双曲線による近似のほうが光合成速度の実測値をより正確に反映する[13,14]．

$$p_{\mathrm{N,i}}=\frac{\varphi I_{\mathrm{L,i}}+p_{\max}-\sqrt{(\varphi I_{\mathrm{L,i}}+p_{\max})^2-4\theta\varphi I_{\mathrm{L,i}}+p_{\max}}}{2\theta}-r_{\mathrm{D}} \qquad \text{式(5)}$$

$\varphi$ は光―光合成曲線の初期勾配，$p_{\max}$ は飽和光下における単位葉面積あたりの光合成速度，$\theta$ は曲度，そして $r_{\mathrm{D}}$ は暗呼吸速度である．次に，彼らは光―光合成曲線を測定した葉の窒素含量を測定し，これらのパラメーターを単位葉面積あたりの窒素含量（$n_{\mathrm{L}}$）の関数として表した．

$$\begin{aligned}\varphi&=a_{\mathrm{p}}+b_{\mathrm{p}}n_{\mathrm{L}}\\ p_{\max}&=a_{\mathrm{m}}+b_{\mathrm{m}}n_{\mathrm{L}}\\ \theta&=a_{\mathrm{t}}+b_{\mathrm{t}}n_{\mathrm{L}}\\ r_{\mathrm{D}}&=a_{\mathrm{r}}+b_{\mathrm{r}}n_{\mathrm{L}}\end{aligned} \qquad \text{式(6)}$$

$a$ と $b$ は回帰係数である．セイタカアワダチソウにおける測定の結果を図 4 に示す．$n_{\mathrm{L}}$ と $p_{\max}$，$n_{\mathrm{L}}$ と $r_{\mathrm{D}}$ の間には強い正の相関がある．同様の結果が多くの種で報告されているが，$n_{\mathrm{L}}$ の増加に対して $p_{\max}$ が飽和することもある[15–17]．$\varphi$ と $n_{\mathrm{L}}$ の間にも正の相関が見られるが，多くの場合相関は低い[17–21]．$\theta$ と $n_{\mathrm{L}}$ の間には，弱い負の相関が見られる．他の種でも，相関は低い[17,19] か見られない[18,20,21]．また，これらの関係は，同じ種であっても季節によって変わる[22–26]．

彼らは，2 つの個体密度の異なるセイタカアワダチソウ群落からそれぞれ 3 個体ずつ採取し，そのうち約 40 枚

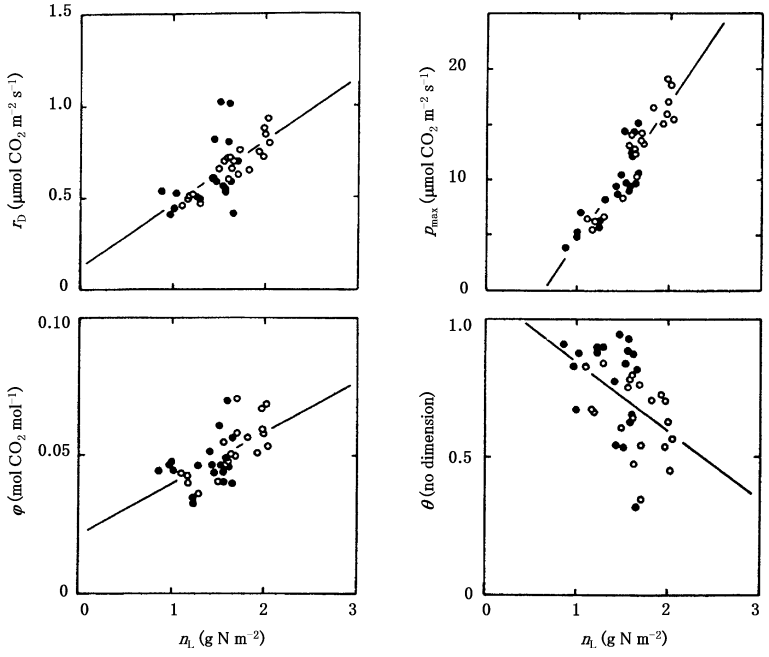



**図 4**：セイタカアワダチソウ群落における，単位葉面積あたりの窒素含量（$n_{\mathrm{L}}$）と飽和光下光合成速度（$p_{\max}$），光―光合成曲線の初期勾配（$\varphi$），曲度（$\theta$），暗呼吸速度（$r_{\mathrm{D}}$）の関係．●は高密度，○は低密度群落の，様々な層から採取した葉を示す．T. Hirose と M. J. A. Werger[12] を改変．

の葉について光―光合成曲線を測定した．それらの葉の窒素含量（$n_L$）を測定し，係数 $a$ と $b$ を得た．次に，層別刈り取りを行い，式 (2) を用いて各層の葉の吸収光強度（$I_{L,i}$）を求めた．層毎に窒素含量（$n_{L,i}$）を測定し，式 (6) を用いて $n_{L,i}$ から $p_{max}$，$\varphi$，$\theta$，$r_D$ を計算した．これらの葉の光合成を決定するパラメーターと $I_{L,i}$ を式 (5) に代入することで各層の単位葉面積あたりの光合成速度（$p_{N,i}$）を求めた．そして，$p_{N,i}$ に当該層の LAI を乗じて，全層にわたって積算することで，群落の光合成速度を得た．このようにして，群落内における光と光合成能力の勾配を反映した群落光合成速度の推定が可能となった．全ての葉が同じ量の窒素を持つと仮定した場合に比べて，実際の群落は 21%高い群落光合成を実現していることがシミュレーションによって示された[12]．

## 2.b-1.4　直達光を考慮した群落光合成モデル

### 2.b-1.4.1　散乱光だけを考慮したモデルの問題点

M. Monsi と T. Saeki[2] の群落光合成モデルでは，群落に降り注ぐ光はすべて大気中の粒子や水蒸気などによって散乱した光（散乱光）であり，群落内の同じ高さ（同じ層）にある葉の吸収光強度は同じである，と仮定されていた．この仮定は，晴天日には必ずしも正しくない．晴天日には，直達光が群落内に射し込み，同じ高さにある層のなかに吸収光強度が大きい葉と小さい葉が混在する．直達光がどのように群落内に射し込み群落内の葉に照射されるのかは，太陽光の入射角，葉の傾斜角や方位角，サイズなどによって変わる．また，太陽光の入射角は日や時間とともに変化する．同じ層内の中の光環境が不均一であるにもかかわらず，全ての葉が同じ強さの散乱光を受け取ると仮定してしまうと，群落光合成速度は過大評価となる．なぜならば，光に対する光合成速度の応答は飽和型の曲線であり，極度に強い光があたった場合，光合成速度はさほど高くならないからである．

### 2.b-1.4.2　直達光を考慮した群落光合成モデル

直達光を群落光合成モデルに組み込む試みは，黒岩と門司[27] に始まり，その後同様のモデルが次々と発表された[28–32]．ここでは N. P. R. Anten[32] のモデルに基づいてその概要を紹介する．

1）群落を垂直方向に複数の層に分ける．
2）各層の葉が受けとる光の強さを計算する．直達光が当たっている葉は直達光と散乱光の両方を受け取り，直達光が当たっていない（すなわち他の葉の陰になっている）葉は散乱光のみを受け取る．

層 i において，直達光が当たっている葉の吸収光強度（$I_{sl,i}$）は以下のようになる．

$$I_{sl,i}=I_{sh,i}+\frac{OI_{0dr}}{(\sin\beta_s)} \qquad 式(7)$$

$I_{sh,i}$ は層 i の葉が受け取る散乱光，$O$ は太陽光の入射方向から見たときの葉の投影面積，$I_{0dr}$ は群落上において水平面が受け取る直達光，$\beta_s$ は太陽高度である．上式の右辺第一項は葉が受け取る散乱光成分，右辺第二項は直達光成分を表している．

$O$ は葉の傾斜角と太陽高度によって変化する（図 5）が，全ての組み合わせについて $O$ を求めるのは労力的に困難である．J. Gourdriaan[33] は，葉の傾斜角を 3 クラス（30° 刻み）あるいは 9 クラス（10° 刻み）に分けて群落光合成速度の推定を行い，この単純化が光合成の推定に及ぼす影響を比較検討した．群落光合成速度の推定精度は，10° 刻み，30° 刻みのいずれにおいても高く，葉の傾斜角は 3 クラスに分ければ十分であることが示された．$O$ は以下の式から求められる．

$$O=f_{15}O_{15}+f_{45}O_{45}+f_{75}O_{75} \qquad 式(8)$$

$O_{15}O_{45}$，$O_{75}$ は，それぞれ，傾斜角が 0 －30°，30－60°，60－90°（15，45，75 はそれぞれの平均値を表している）の葉の $O$ である．$f_{15}$，$f_{45}$，$f_{75}$ は，各傾斜角クラスに属する葉の割合である（図 6）．$O_{15}$ は，以下の式から得られる．

$$O_{15}=\sin\beta_s\cos(15) \qquad 式(9a)$$

$$O_{15}=\frac{2}{\pi}\left[\sin\beta_s\cos(15)\arcsin\left(\frac{\tan\beta_s}{\tan(15)}\right)+(\sin^2\beta_s+\sin^2(15))^{0.5}\right] \qquad 式(9b)$$

式（9a）と式（9b）は，それぞれ葉の表側と裏側から直達光が当たる場合を考慮している．$\beta_s$ が葉の傾

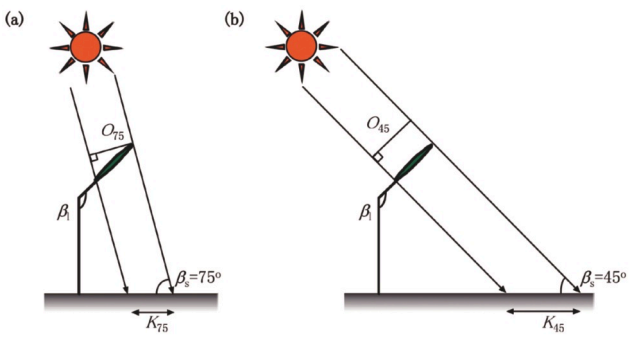



**図 5**：太陽の入射方向から見た葉の投影面積（$O$）と，太陽高度（入射角；$\beta_s$），葉の傾斜角（$\beta_l$），吸光係数（$K$）の関係の模式図．例として，$\beta_s$ が 75°（a）と 45°（b）の場合を示す．

斜角より大きい時には式（9a）を，$\beta_s$ が葉の傾斜角より小さい時には式(9b)を用いる．$O_{45}$ と $O_{75}$ も同様に求める．

他の葉の陰になっている葉の吸収光強度（$I_{sh,i}$）は以下のようになる．

$$I_{sh,i}=\frac{K_{df}}{(1-\sigma)^{0.5}}(I_{df,i}+I_{drdf,i}) \qquad 式(10)$$

$K_{df}$ は散乱光の吸光係数，$\sigma$ は葉の散乱係数，$I_{df,i}$ は層 i において水平面が受け取る散乱光の光強度，$I_{drdf,i}$ は層 i において水平面が受け取る，直達光から派生した散乱光の光強度である．$K_{df}$ は，式（1）の $K$ と同じである．$I_{df,i}$ は次式を使って求められる．

$$I_{df,i}=I_{0df}\exp(-K_{df}F_i) \qquad 式(11)$$

$I_{0df}$ は群落上において水平面が受け取る散乱光の光強度である．

直達光が大気を通過するときや葉に当たったときにその一部は透過や反射によって散乱する．直達光由来の散乱光の光強度は，「葉に当たった光の一部は反射・透過される」と仮定して推定した直達光の光強度から，「群落内の葉は黒色で全く反射・透過をしない」と仮定して推定した直達光の光強度を差し引くことで推定できる[31,34]．層 i における，直達光から派生した散乱光（$I_{drdf,i}$）は次のように表される．

$$I_{drdf,i}=I_{dr,i}-I_{drdr,i} \qquad 式(12)$$

$I_{dr,i}$ は層 i において水平面が受け取る直達光の光強度，$I_{drdr,i}$ は，層 i における，散乱しない直達光の光強度である．$I_{dr,i}$ と $I_{drdr,i}$ は，それぞれ次式で求められる．

$$I_{dr,i}=I_{0dr}\exp(-K_{bl}(1-\sigma)^{0.5}F_i) \qquad 式(13)$$
$$I_{drdr,i}=I_{0dr}\exp(-K_{bl}F_i) \qquad 式(14)$$

$K_{bl}$ は直達光の吸光係数で，以下の式によって求められる．

$$K_{bl}=O/\sin\beta_s \qquad 式(15)$$

以上のように，このモデルでは群落内の散乱光の減衰は M. Monsi と T. Saeki[2] が示したのと同様に Lambert-Beer の法則に従い，直達光は，光の強さは変わらず下層ほど直達光が当たる葉（葉面積）の割合が減る，としている．

3）各層の葉の光合成速度を計算する．層 i の葉の単位葉面積あたりの光合成速度（$p_{N,i}$）は，次式で求められる．

$$p_{N,i}=f_{sl,i}p_{sl,i}+(1-f_{sl,i})p_{sh,i} \qquad 式(16)$$

$p_{sl,i}$ と $p_{sh,i}$ は，それぞれ太陽光が直接当たっている葉と，他の葉の陰になっている葉の単位葉面積あたりの光合成速度である．$f_{sl,i}$ は，層 i における，太陽光が直接当たる葉（葉面積）の割合である．

$$f_{sl,i}=\exp(-K_{bl}F_i) \qquad 式(17)$$

他の葉の陰になっている葉の割合は，$1-f_{sl,i}$ となる．このように，$f_{sl,i}$ は太陽高度，葉の傾斜角，そして LAI の関数として求められる．葉の方位角も $f_{sl,i}$ に影響するが，計算を簡単にするために，ここでは葉の方位角は spherical（全ての方位角が同じ確率）であると仮定している．

4）$p_{N,i}$ に当該層の LAI を乗じ，それを全層にわたって積算すれば，単位土地面積あたりの群落の光合成速度が求められる．

C. J. T. Spitters[40] はシミュレーションによって，直達光と散乱光の両方を考慮して推定した群落光合成速度に比べて，散乱光のみを考慮した群落光合成速度は最大で4％過大評価となることを示した．ただし，Spitters を含めほとんどのモデルでは，光合成の推定においていくつかの問題点がある．まず，群落内の位置による葉の生理的特性の違いが適切に組み込まれていないか，あるいは全く考慮されていない．そして多くの場合，光―光合成曲線の近似に直角双曲線が用いられている．また，葉の傾斜角は spherical であると仮定されている．N. P. R. Anten[32] は，J. Goudriaan[33] の方法に従って実測した葉の傾斜角を計算に組み込み，葉間の光合成特性の勾配を考慮して，両モデルを比較検討した．イネとパールミレット群落において，直達光を考慮した場合に比べて，散乱光のみを考慮した場合，群落光合成速度は最大で 30％過大評価されることが示された[32]．この過大評価は，先に述べたように，葉が受け取る光の強さと光合成速度の関係が飽和型の曲線であるがゆえに生じたものである．

## 2.b-1.5　マニュアル：群落光合成速度の推定

ここでは，直達光を考慮した群落光合成速度の推定方法を紹介する．わかりやすさのために，同じサイズの個体からなる，単一種群落を対象として説明する．

［調査地での測定］

1）調査区（枠）の設置

まず，調査区を設置する．調査区内の物理的環境が広範囲にわたって均一な場所を選ぶ．対象とする材料や場所にもよるが，調査区（枠）の大きさは一辺が 0.5〜1.0 m 程度の正方形をすすめる．このサイズならば，群落を破壊することなく，内部まで手や測定機材を入れることが可能である．調査枠の四隅に，目盛りを書いたポールを垂直に立てる．

2）葉の傾斜角

分度器やクリノメーターを用いて，調査区内にある葉の傾斜角を測定する．葉の傾斜角とは，地面と平行な水平面と葉の間の角度である．それほど細かく読み取る必要はなく，30°間隔（図 6）で良い[33]．30〜50 枚程度の葉について測定する．イネのように葉身が長くたわんでいる場合，葉を 2，3 の部位に区切って測定する．群落内に手を差し込む際に，葉の位置が大きく変わらないよう注意する．

3）群落内の光の分布

群落内の散乱光の分布を測定する．光量子センサーを 2 つ用意し，片方のセンサーに対してもう片方のセンサーを校正しておく．ひとつは，全天下の光強度（$I_0$）を測定するため，群落よりも高い場所に水平に設置する．もうひとつは群落内の光強度（$I_l$）の測定に用いる．まず，地表面の $I_l$ を測定する．細長い棒などの先端に固定した光量子センサーを，群落内部に差し込み，地際に保持する．このとき，センサーを水平に保つよう注意する．$I_l$ と $I_0$ の値を同時に読み取る．1 人だと同時に読み取るのは難しいので，2 人で行うと良い．センサーの高さを維持したまま，群落内で位置をずらし，同様の測定を数回行う．複数の光量子センサーが配列された棒状の測定器（Decagon Devices 社（Pullman, USA）の「AccuPAR LP-80」や Li-Cor 社（Lincoln, USA）の「ロング光量子センサー」など）は，広範囲の光強度の平均値が得られるので，この測定に向いている．それが終わったら，センサーの高さを 10〜20 cm 上げて同様の測定を繰り返す．測定は曇天日に行う．全ての光が散乱光であるだけでなく，光強度の変動が小さく 2 つのセンサーの値を同時に読み取るのが容易であり，誤差が小さくなる．

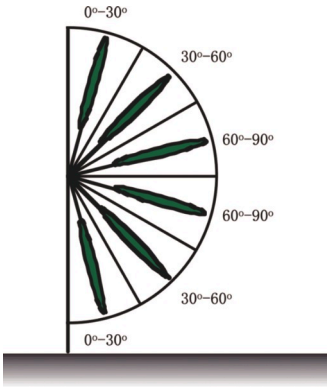



**図 6**：葉の傾斜角の模式図．傾斜角を 3 つのクラス（0°－30°，30°－60°，60°－90°）に分けた場合の例．

4）層別刈り取り

剪定ばさみを用いて，調査枠内の植物体を，上から一定の厚さで層状に切り取っていく．ポールの間にロープやタコ糸を張って，切り取る位置（高さ）を明確にするとよい．層の厚さは，群落の高さや目的にもよって異なる．群落の高さが 1 m 以上あるなら，層の厚さは 20 cm，群落の高さが 1 m 以内ならば，層の厚さは 10 cm を目安にする．群落全体の光合成速度を知りたいのであればおおまかな分け方で良いが，背丈の異なる種や個体間の比較を行いたい場合には細かく分ける必要がある．群落の高さを 10 あるいは 20 の倍数に設定すると，ちょうど地面が 0 cm となり区切りがいい．ある葉や枝を切り取ったときに，他の葉の角度や位置が変わってしまわないように注意する．一番上の層を刈り取ったら，その後，同様の手順で地面まで刈り取りを続ける．切り取った植物体は，乾燥して葉が縮むのを避けるため，ポリエチレン袋などに入れて実験室に持ち帰る．

種毎，個体毎に光合成を推定したい場合，細かく切り刻まれたサンプルから種や個体を区別するのは難しいことがある．この場合には，野外では層別刈り取りを行わず，地際で全植物を刈り取り，実験室に持ち帰ってから種や個体に選別し，層別に切り分けても良い．ただし，葉の高さや角度などについて，なるべく現地の状態を再現するよう注意を払う必要がある．

5）葉の光合成特性

層別刈り取りを行った群落と隣接した場所で，なるべく物理的環境が似ている個体を選び，葉の光合成速度を測定する．携帯型光合成測定装置を用いて，光―光合成曲線が得られるように，葉に照射する光の強さを変えて測定を行う．様々な高さにある葉 10〜30 枚程度を対象に同様の測定を行う．測定方法についての詳細は，多くの良書[35,36]が出版されているので，そちらを参照されたい．光合成速度の測定が終了したら，測定に用いた葉を切り取り，乾燥しないようにポリエチレン袋などに入れ，実

験室に持ち帰る．据え置き型の光合成測定装置を用いる場合は，植物を切り取り，水差しにして実験室に持ち帰り，上と同様の測定を行う．

**[実験室での測定]**

実験室に着いたらすぐに，層別刈り取りをしたサンプルを袋から出し，生きている部分と枯死した部分に分ける．層毎に，生きている部分の葉の葉面積を測定する．ベルト式の葉面積計を使うと，大量のサンプルを短時間で測定できる．また，スキャナーで葉の画像をパソコンに読み込み，画像解析ソフトで計測する方法もある．この方法は，測定精度は高いが若干時間と手間がかかる．サンプルを十分に乾燥させた後，乾燥重量と窒素濃度を測定する．種毎に光合成速度を推定したい場合，乾燥させる前に種毎に分けて別の袋に入れる．乾燥したサンプルから種を同定するのは難しい．光合成測定に用いた葉についても，同様に葉面積を測定し，十分に乾燥させたあと窒素濃度を測定する．

**[群落光合成速度の計算]**

1）群落に降り注ぐ直達光と散乱光

まず，雲のない完全な晴天下において，群落にふりそそぐ直達光（$I_{0dr}$）と散乱光（$I_{0df}$）の日変化を求める．はじめに，群落光合成速度を推定したい日の，太陽高度（$\beta_s$）の日変化を次式を使って求める[37]．

$$\sin\beta_s=\sin\beta_{lat}\sin\beta_{dec}+\cos\beta_{lat}\cos\beta_{dec}\cos\left(2\pi\frac{(t_h-12)}{24}\right) \quad 式(18)$$

$\beta_{lat}$ は調査地の緯度，$\beta_{dec}$ は当該日の赤緯（$\beta_{lat}$ と $\beta_{dec}$ の単位はラジアン），$t_h$ は太陽時である．$t_h$ を変えることによって，$\beta_s$ の日変化が得られる．

次に，次式を使ってエアマス（$m$）を計算する．

$$m=[(1229+(614)\sin\beta_s)^2]^{0.5}-614\sin\beta_s \quad 式(19)$$

エアマスは相対大気路程ともいい，ある太陽高度において太陽光が大気を通過する距離を示す尺度である．太陽が天頂にあるときに太陽光が大気中を垂直方向に横切る距離を1としたときの，相対値で表す．

式（18）と式（19）を次式に代入し，群落にふりそそぐ直達光（$I_{0dr}$）と散乱光（$I_{0df}$）の日変化を求める．

$$I_{0dr}=S_c\tau^m\sin\beta_s \quad 式(20a)$$
$$I_{0df}=S_c(0.271-0.294\tau^m)\sin\beta_s \quad 式(20b)$$

$S_c$ は太陽定数（2510 $\mu$mol photons $m^{-2}$ $s^{-1}$），$\tau$ は大気透過率で，0.7程度を仮定すればよい[37]．

曇天日の場合，群落にふりそそぐ散乱光（$I_{0df}$）の日変化は次式で近似できる[28]．

$$I_{0df}=500\sin\beta_s \quad 式(21)$$

ここでは，空の明るさは一様であると仮定している．

群落に降り注ぐ太陽光のうち散乱光と直達光の比率は，Delta-T Devices社（Cambridge, UK）の「sunshine sensor」や，Climatec社（Tokyo, Japan）の「シャドウバンド」といった装置を用いて測定することができる．また，大気透過度やエアマスの関数として推定する方法もある[38-40]．

2）直達光と散乱光の群落内垂直分布

群落内の直達光と散乱光の分布を推定する．まず，図3のように，実測した各層の相対光強度（$I_i/I_0$）の対数とLAIの関係を図式化し，回帰式の傾き（すなわち散乱光の吸光係数；$K_{df}$）を得る．次に，各層における，群落上からその層までの積算LAI（$F_i$）を計算する．$F_i$，$K_{df}$ と $I_{0df}$ を式（11）に代入し，層iにおいて水平面が受ける散乱光の光強度（$I_{df,i}$）を層毎に計算する．

葉の傾斜角について，3つのクラス（0－30°，30－60°，60－90°）に属する葉の割合（それぞれ $f_{15}$，$f_{45}$，$f_{75}$ とする）を計算する．これらの値を式（8）に代入し，太陽光の入射方向から見たときの葉の投影面積（$O$）を計算する．$O$ と $\beta_s$ を式（15）に代入し，直達光の吸光係数（$K_{bl}$）を求める．

$K_{bl}$，$I_{0dr}$ と $F_i$ を式（13）に代入し，層iにおいて水平面が受ける直達光の強さ（$I_{dr,i}$）を層毎に計算する．式（13）内の $\sigma$ は葉の散乱係数で，0.2程度を仮定すればよい[34]．$K_{bl}$，$I_{0dr}$ と $F_i$ を式（14）に代入し，各層における直達光のうち散乱しない光の強さ（$I_{drdr,i}$）を計算する．$I_{dr,i}$ と $I_{drdr,i}$ の差から，直達光から派生する散乱光（$I_{drdf,i}$）を求める（式（12））．

$K_{df}$ と $I_{df,i}$，$I_{drdf,i}$ を式（10）に代入し，層iの葉が散乱光のみを受け取る場合の吸収光強度（$I_{sh,i}$）を層毎に計算する．

$I_{sh,i}$，$O$，$I_{0dr}$，$\beta_s$ を式（7）に代入し，層iの葉が直達光と散乱光の両方を受け取る場合の吸収光強度（$I_{sl,i}$）を層毎に計算する．

3）各層の光合成速度

作図ソフトなどを用いて，光―光合成曲線の測定データを非直角双曲線（式（5））で近似する．回帰式から，光飽和光合成速度（$p_{max}$），初期勾配（$\varphi$），曲度（$\theta$），暗呼吸速度（$r_D$）を得る．測定した全ての葉についてこれら

の値が得られたら，図4のように，各々の葉の単位葉面積あたりの窒素含量との関係式を得る（式(6)）．層別刈り取りを行ったサンプルの，各層の単位葉面積あたりの窒素含量をこれらの関係式に代入し，各層の $p_{max}$，$\varphi$，$\theta$，$r_D$ を求める．層毎に，$p_{max}$，$\varphi$，$\theta$，$r_D$ と $I_{sh,i}$ を式(式(5))に代入し，層内の全ての葉が散乱光のみを受け取ったときの単位葉面積あたりの光合成速度（$p_{sh,i}$）を求める．同様に，$p_{max}$，$\varphi$，$\theta$，$r_D$ と $I_{sl,i}$ を式（式（5））に代入し，層内の全ての葉が直達光と散乱光の両方を受け取ったときの単位葉面積あたりの光合成速度（$p_{sl,i}$）を求める．

$K_{bl}$ と $F_i$ を式（17）に代入し，層 i における直達光を受け取る葉の割合（$f_{sl,i}$）を計算する．

$f_{sl,i}$，$p_{sl,i}$，$p_{sh,i}$ を式(16)に代入し，層 i の平均光合成速度（$p_{N,i}$）を計算する．$p_{N,i}$ に層 i の LAI を乗じ，全ての層にわたって積算すれば，単位土地面積あたりの群落光合成速度が得られる．

完全な曇天下における各層の葉の受光量は，式（10）によって求めることができる．ここで $I_{drdf,i}$ はゼロとして扱えばよい．

## 2.b-1.6 おわりに

本節で紹介したモデルの主目的は，植物と環境の間の相互作用を理解することである．これらのモデルは，群落全体の光合成速度だけではなく，群落を構成する個体[17,41−43]や個葉[25,44]の光合成速度を推定することができる．それゆえ，個体の炭素獲得量を最大にする植物の適応的な特性を知りたい場合や，複数の種がどのような機構で共存しているかを知りたい場合には，ここで紹介したモデルが活躍する[45−47]．また，光以外の環境要因(気温，VPD，$CO_2$ 濃度など)の群落内の変異が群落光合成に及ぼす影響や，環境変化に対する植物群落の応答を解析するモデルもある[39,48]．これらは，進行しつつある地球環境変化に対する植物群落の応答を予測するうえで有効な手段になろう．

ここで紹介した群落光合成モデルはいずれも，半影，雲や風の非規則的，偶然的な変動，それによる直達光と散乱光の群落内分布の変動は考慮していない．群落光合成に影響を及ぼす要因の全てをモデル化するのは難しく，現実的ではない．あくまでも，植物が置かれた環境のなかで，それらが互いにどのように関わり合うのかという因果律を解析するための手法であることに留意したい．

## 謝辞

本稿の執筆に当たって多くの助言を下さった廣瀬忠樹氏と Niels Anten 氏に深く感謝する．

## 引用文献

1）P. Boysen Jensen, Die Stoffproduktion der Pflanzen, Jena: Gustav Fischer (1932)
2）M. Monsi & T. Saeki, Japanese Journal of Botany **14** (1953) P.22
3）T. Saeki, Botanical Magazine, Tokyo **73** (1960) P.55
4）T. Saeki, Botanical Magazine, Tokyo **72** (1959) P.404
5）J. M. Hopkinson, Journal of Experimental Botany **15** (1964) P.125
6）R. H. Brown & R. B. Cooper & R. E. Blaser, Crop Science **6** (1966) P.206
7）H. A. Mooney & S. L. Gulmon, Topics in Plant Population Biology, eds O. T. Solbrig, S. Jain, G. B. Johnson & P. H. Raven, New York, Columbia University Press (1979) P.316
8）L. Natr, Photosynthesis and Productivity in Different Environments, ed J. P. Cooper, London, Cambridge University Press (1975) P.537
9）J. R. Evans, Oecologia **78** (1989) P.9
10）J. R. Evans & J. R. Seeman, Photosynthesis ed W. R. Brigs, New York, Alan R. Liss, Inc. (1989) P.183
11）C. B. Field, Oecologia **56** (1983) P.341
12）T. Hirose & M. J. A. Werger, Oecologia **72** (1987) P.520
13）I. R. Johnson & J. H. M. Thornley, Journal of Theoretical Biology **107** (1984) P.531
14）I. Terashima & T. Saeki, Annals of Botany **56** (1985) P.489
15）D. G. Lugg & T. R. Sinclair, Photosynthetica **15** (1981) P.138
16）J. R. Evans, Plant Physiology **72** (1983) P.297
17）K. Hikosaka, S. Sudoh & T. Hirose, Oecologia **118** (1999) P.388
18）T. L. Pons, F. Schieving, T. Hirose & M. J. A. Werger, Causes and consequences in growth rate and productivity of higher plants, eds H. Lambers, M. L. Cambridge, H. Konings, T. L. Pons, The Hague, SPB Academic Publishing, (1989) P.175
19）F. Schieving, T. L. Pons, M. J. A. Werger & T. Hirose, Plant and Soil **142** (1992) P.9
20）N. P. R. Anten, F. Schieving & M. J. A. Werger, Plant and Soil **142** (1995) P.504
21）N. P. R. Anten, M. J. A. Werger & E. Medina, Plant Ecology **138** (1998) P.63
22）P. Egli & B. Schmid, Acta Oecologia **20** (1999) P.559

23）F. Schieving, M. J. A. Werger & T. Hirose, Vegetatio **102** (1992) P.173
24）A. Borjigidai, K. Hikosaka, T. Hirose, T. Hasegawa, M. Okada & K. Kobayashi, Annals of Botany **97** (2006) P.549
25）S. Oikawa, K. Hikosaka & T. Hirose, New Phytologist **172** (2006) P.104
26）Y. Matsumoto, S. Oikawa, Y. Yasumura, T. Hirose, K. Hikosaka, Oecologia **157** (2008) P.185
27）黒岩澄雄，門司正三，農業気象 **18**（1962）P.143
28）C. T. de Wit, Photosynthesis of leaf canopies. Agricutural Research Report No. 663, Wageningen, Pudoc (1965)
29）W. G. Duncan, R. S. Loomis, W. A. Williams, & R. Hanau, Hilgardia **38** (1967) P.181
30）T. R. Sinclair & T. Horie, Crop Science **29** (1989) P.90
31）C. J. T. Spitters, Agricultural and Forest Meteorology **38** (1986) P.231
32）N. P. R. Anten, Ecological Research **12** (1997) P.77
33）J. Goudriaan, Agricultural and Forest Meteorology **43** (1988) P.155
34）J. Goudriaan, Crop micrometeorology: a simulation study. Simulation Monographs. Wageningen, Pudoc (1977)
35）S. P. Long & J.-E. Hällgren, Photosynthesis and production in a changing environment. A field and laboratory manual, eds D. O. Hall, J. M. O. Scurlock, H. R. Bolhar-Nordenkampf, R. C. Leegood & S. P. Long, London, Chapman & Hall (1993) P.129
36）村岡裕由，光と水と植物のかたち，種生物学会編，東京，文一総合出版（2003）P.229
37）D. M. Gates, Biophysical Ecology. Berlin, Springer-Verlag (1980)
38）C. J. T. Spitters, H. A. J. M. Toussaint & J. Goudriaan, Agricultural and Forest Meteorology **38** (1986) P.217
39）D. G. G. de Pury & G. D. Farquhar, Plant, Cell & Environments **20** (1997) P.537
40）M. L. Roderick, Agricultural and Forest Meteorology **95** (1999) P.169
41）N. P. R. Anten & T. Hirose, Journal of Ecology **87** (1999) P.583
42）N. P. R. Anten & T. Hirose, Oecologia **129** (2001) P.186
43）N. P. R. Anten & T. Hirose, Ecology **84** (2003) P.955
44）T. Hirose & M. J. A. Werger, Physiologia Plantarum **70** (1987) P.215
45）彦坂幸毅，光と水と植物のかたち，種生物学会編，東京，文一総合出版（2003）P.57
46）N. P. R. Anten, Annals of Botany **95** (2005) P.495
47）T. Hirose, Annals of Botany **95** (2005) P.483
48）R. Leuning, F. M. Kelliher, D. G. G. de Pury & E.-D. Schulze, Plant, Cell & Environment **18** (1995) P.1183
49）村岡裕由，光と水と植物のかたち，種生物学会編，東京，文一総合出版（2003）P.215

# 2．個体から群落スケールの $CO_2$ ガス交換
## b．群落の物質生産
### b-2．植物のサイズと成長 ── 成長解析 ──

長嶋　寿江[1)]

植物の成長は，光合成生産速度だけでなく，葉への分配など成長のしかたにも大きく影響される．本章では，成長を解析する方法と，それを行うための実験デザイン，測定方法について述べる．

## Plant Growth Analysis

Hisae Nagashima

Because photosynthetic products are used to produce new assimilating organs, plant growth is influenced by biomass allocation as well as photosynthetic rate of individual leaves. A traditional method for analysising plant growth, including the experimental design and measurement methods, is outlined.

### 2.b-2.1　成長解析

植物は，光合成で得た産物をもとに根・茎・葉などの器官を新たに成長させ，それらがまた光や水・栄養の獲得を行い生産を行う，という拡大再生産的な成長を行う．そのため，最終的な成長量は，葉面積当たりの光合成生産速度だけでなく，得た産物をどのように各器官に分配するかなどの植物の成長のしかたによっても大きく左右される（図１）．植物の最終的なサイズは，農学的にも生態学的にも重大な関心事であるため，植物の成長を解析する様々な方法が開発されてきた．それらのうち標準的で最も広く使われる方法が，1900 年代初期に作物学者ら[1–2)]によって考え出された「成長解析（growth analysis）」と呼ばれる手法である[3–5)]．

成長解析では，成長が複利的で個体サイズに依存するという植物の特徴をふまえ，成長を相対成長速度（relative growth rate, RGR）で表す．

$$RGR=\frac{1}{W}\frac{dW}{dt}=\frac{d(\ln W)}{dt}[\mathrm{d^{-1}\ または\ week^{-1}}] \quad (1)$$

$W$ は個体全体の乾燥重量（g），$t$ は時間（day，week など）である．RGR は SGR（specific growth rate）と呼ばれることもある．農学的・生態学的に非常に有用な成長の指標である．理論上，$W$ は生きている部分の乾燥重量であるが，道管など生きていなくても機能している組織もあり，死んだ組織を区別して測定するのは実際的でないため，通常は区別しない．しかし死んだ組織（材）が大きな部分を占める樹木などの場合は，生産が行われる組織や一年間の成長量を $W$ とすることがある[6–7)]（森林の成長や純一次生産量の評価については，2a-3 章を参照）．$W$ の変化量は，期間中の純同化量（＝総同化量－呼吸量）からその期間に死亡した植物体部分を差し引いた値となる．純同化量に日内変動があることを考えると，１日が最小の測定間隔となる．

もし全個体重に対する葉面積の割合が一定で，葉面積当たりの物質生産速度も一定であれば，RGR は一定の値

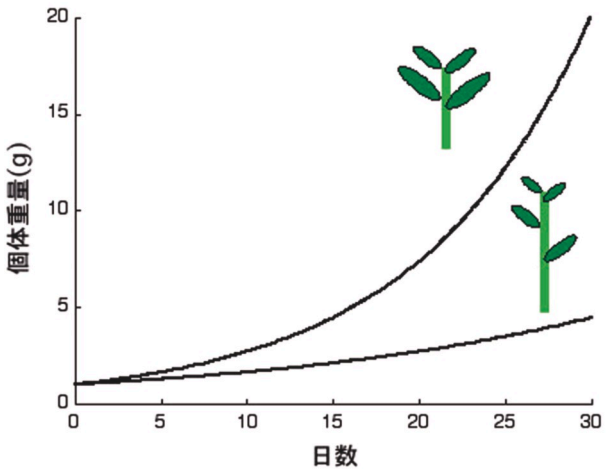



図１：個体重に対する葉面積の割合（LAR）が 2 倍異なる仮想上の植物の成長．葉面積当たりの物質生産量（NAR）が一定の場合，LAR が 2 倍になると相対成長速度（RGR）も 2 倍になる．図の植物は，初期重量を 1 g，RGR を 0.1 $day^{-1}$（上の個体），0.05 $day^{-1}$（下の個体）として計算．30 日後には個体重量が 4.5 倍異なった．

1）東北大学大学院生命科学研究科生態システム生命科学専攻機能生態分野

となり，植物の個体重は時間とともに指数関数的に増大する．一方，同化産物の葉への分配率や光合成速度が変化すればRGRも変化する．RGRは以下のように「純同化速度（net assimilation rate, NAR）」と「葉面積比（leaf area ratio, LAR）」に分解される．

$$RGR = NAR \times LAR \tag{2}$$

$$NAR = \frac{1}{A}\frac{dW}{dt}[\mathrm{g\ m^{-2}d^{-1}\ または\ g\ m^{-2}\ week^{-1}}] \tag{3}$$

$$LAR = \frac{A}{W}[\mathrm{m^2 g^{-1}}] \tag{4}$$

$A$は同化が行われる部分の面積であり，通常は葉面積（$m^2$）が用いられる．光合成を行う茎の表面積を含めたり，針葉など表面積を求めるのが困難な場合には葉の乾燥重量を代用することもある．また，植物体のクロロフィル量や葉窒素量，葉タンパク質量，カルボキシル化酵素量を代わりに用いることもできる．NARはULR（unit leaf rate）と呼ばれることもあり，葉の光環境や光合成能力に影響される．

LARはさらに「比葉面積（specific leaf area, SLA）」と「葉重量比（leaf weight ratio, LWR）」に分解される．

$$LAR = SLA \times LWR \tag{5}$$

$$SLA = \frac{A}{W_L}[\mathrm{m^2\ g^{-1}}] \tag{6}$$

$$LWR = \frac{W_L}{W} \tag{7}$$

$W_L$は葉など同化が行われる部分の乾燥重量（g）である．SLAは葉の厚さや機械的支持組織の量に影響されるので葉の構造の指標とされる．種間や種内でも環境によって大きく異なる[8]．種間の比較では葉の寿命と相関がある[9]．SLAの逆数もよく使われ，SLW（specific leaf weight）あるいはLMA（leaf mass area）と呼ばれている（‘specific’は‘per unit mass’を意味するため，SLWは名称として不適切であると指摘されている[10]）．LWRはLWF（leaf weight fraction）と呼ばれることもある．

上記の分解により，植物の成長において，光合成などの生理学的性質の影響（NAR）と植物の形態の影響（LAR，SLA，LWR）を分けて評価することが可能となる．これらパラメーターを他の生育条件下や他種と比較することで，それら植物との成長の違いの原因を探ることができる．このような成長解析は，個体単位だけでなく，群落単位（土地面積当たり）でも行える．

## 2.b-2.2　各パラメーターの算出

成長解析を行うにあたり上記のパラメーターを得るには，ある時間間隔をおいて植物を刈り取り，個体全体や器官の乾燥重量，葉面積を測定する（破壊測定）．あるいは，同一個体について繰り返し非破壊的な測定を行い，別に刈り取った植物のデータから乾燥重量などを推定する（非破壊測定あるいは間接測定）．これらの測定は比較的容易で，成長解析の利点の一つである．一方，これら測定値から上記パラメーターを算出したり，パラメーターの違いを統計学的に評価するのは少し複雑である．パラメーターの算出方法には主にclassical approachとfunctional approachがある[3–5]．classical approachは成長解析が開発された当初から用いられている方法であるが，後に述べるようにいくつか問題を含んでいるため，1960年代にfunctional approachが開発された[11–12]．しかし，これにも別の問題があることがわかり，統計学的手法の改善もあって，近年classical approachも見直されている[13]．

### 2.b-2.2.1　Classical (interval) approach

2つの測定時点の間の期間の平均的な値を求める．瞬間式（式1，3–4，6–7）を積分し，それを測定間隔の時間で割った値となる（表1）．RGRの場合は，

$$RGR = \frac{\ln W_2 - \ln W_1}{t_2 - t_1} \tag{8}$$

となる．破壊測定を行った場合は，各測定時のいくつかの個体の平均値を式（8）に代入することになるが，そのときに，$W$の平均値（$\overline{W}$）ではなく$\ln W$の平均値（$\overline{\ln W}$）を代入する．そうでないと，母集団の真の平均RGR値からの偏り（bias）が生じるおそれがある[14]．

RGRの計算には問題はないが，その他のパラメーターでは少々問題が生じる．例えば，NARの計算では，積分するにあたり$W$と$A$の関係，あるいは，$W$と$t$の関係と$A$と$t$の関係が必要となる．$W$と$A$の間に直線関係を仮定する場合が多いが，実際には二次式や指数関数の方がその関係をよく記述している場合もあるかもしれない．どの関数を選ぶかによって，算出されるNARの値は異なる（表2）．LARにおいても，$A/W$と$t$の関係，あるいは，$A$と$t$の関係と$W$と$t$の関係がわからないと計算できない．多くの場合，LARは時間と共に直線的に変化すると仮定されているが，この場合，NARの計算で仮定した$W$と$A$の関係と矛盾してしまう[15]．また$t_1$と$t_2$における値の平均値を直接，瞬間の式（4）に代入するのも誤りである．したがって，classical approachを用いるときは，これら算出に問題のあるパラメーターは，各

**表 1**：成長解析のパラメーター（Chiariello and Mooney 1989[29] より）

| パラメーター | 単位 | 瞬間的 | Classical* | Functional | |
|---|---|---|---|---|---|
| 相対成長速度<br>（RGR，SGR，$R$） | $d^{-1}$<br>$w^{-1}$ | $\frac{1}{W}\frac{dW}{dt}$ | $\frac{\ln W_2-\ln W_1}{t_2-t_1}$ | $\frac{df(t)}{dt}$<br>ただし<br>$f(t)=\ln W$ | $\frac{1}{f(t)}\frac{df(t)}{dt}$<br>ただし<br>$f(t)=W$ |
| 純同化速度<br>（NAR，ULR，$E$） | $g\,m^{-2}\,d^{-1}$<br>$g\,m^{-2}\,w^{-1}$ | $\frac{1}{A}\frac{dW}{dt}$ | $\frac{1}{t_2-t_1}\int_{t_1}^{t_2}\frac{1}{A}\frac{dW}{dt}dt$ | $e^{(f(t)-g(t))}\frac{df(t)}{dt}$<br>ただし<br>$g(t)=\ln A$ | $\frac{1}{g(t)}\frac{df(t)}{dt}$<br>ただし<br>$g(t)=A$ |
| 葉面積比<br>（LAR，$F$） | $m^2\,g^{-1}$ | $\frac{A}{W}$ | $\frac{1}{t_2-t_1}\int_{t_1}^{t_2}\frac{A}{W}dt$ | $e^{(g(t)-f(t))}$ | $\frac{g(t)}{f(t)}$ |
| 比葉面積<br>（SLA） | $m^2\,g^{-1}$ | $\frac{A}{W_L}$ | $\frac{1}{t_2-t_1}\int_{t_1}^{t_2}\frac{A}{W_L}dt$ | $e^{(g(t)-h(t))}$<br>ただし<br>$h(t)=\ln W_L$ | $\frac{g(t)}{h(t)}$<br>ただし<br>$h(t)=W_L$ |
| 葉重量比<br>（LWR） | | $\frac{W_L}{W}$ | $\frac{1}{t_2-t_1}\int_{t_1}^{t_2}\frac{W_L}{W}dt$ | $e^{(h(t)-f(t))}$ | $\frac{h(t)}{f(t)}$ |

$W$，乾燥重量（g）；$t$，時間；$A$，葉面積（$m^2$）；$W_L$，乾燥葉重量（g）．
＊$W$，$A$，$W_L$ の間に特定の関係を仮定しない一般的な表現．

**表 2**：classical approach における $W$ と $A$ の関係を仮定した NAR の計算式（Radford 1967[15]，Chiariello and Mooney 1989[29] より）

| $W$ と $A$ の関係 | NAR の式 |
|---|---|
| $W=c+bA$ | $\left(\frac{W_2-W_1}{A_2-A_1}\right)\left(\frac{\ln A_2-\ln A_1}{t_2-t_1}\right)$ |
| $W=c+bA^2$ | $\frac{2(W_2-W_1)}{(A_2+A_1)(t_2-t_1)}$ |
| $W=c+bA^a$ | $\left(\frac{a}{a-1}\right)\left(\frac{W_2-W_1}{t_2-t_1}\right)\left(\frac{A_2^{a-1}-A_1^{a-1}}{A_2^a-A_1^a}\right)$ |
| $W=c+bA+dA^2$ | $\frac{b(\ln A_2-\ln A_1)}{t_2-t_1}+\frac{2\,d(A_2-A_1)}{t_2-t_1}$ |

測定時の瞬間値として提示するほうがよいかもしれない．あるいは，$W$，$W_L$，$A$ の測定値からこれらの値の間の関係式を導く必要がある．

このような問題の他にも，測定時点間での RGR の変動（fluctuation）が大きく，生育期間を通した傾向がつかみにくいといった問題がある[4]．変動の原因は，例えば，時点 $t_2$ に大きな値のはずれ値があった場合，$t_1$-$t_2$ 間の RGR は大きめに出る一方で，$t_2$-$t_3$ 間の RGR は小さめに出てしまう，といったことである．これは，各測定時点で最大値と最小値を取り除くというデータのトリミングを行うことである程度避けられる．

さらに，パラメーターの値の違いを統計学的に評価するのが難しいという問題がある．破壊測定の場合，成長量の反復個体間のばらつきがわからないため，RGR や NAR の分散を直接求めることができず，通常の統計学的手法が使えない．この問題に対して古くからとられている対策は pairing という方法で，ある測定時点の個体を別の測定時点の個体と組にして同じ個体とみなして計算する手法である．ランダムに選んだり，$W$ の順位が同じ個体を選んだりする．実験開始前に似たようなサイズの個体をあらかじめグルーピングしておく方法もある[3]．個体サイズが比較的均一であれば有効かもしれないが，いずれの方法でも反復個体間のばらつきを実際と異なって評価してしまう可能性がある．ランダムに組んだ場合は過大評価，同順位で組んだ場合は過小評価してしまうかもしれない．２つめの方法は，統計学的定理を用いて各測定時の $W$ のばらつきから RGR の分散を計算して推定する方法である[16-17]（後述）．この場合 paring は不要である．この分散値をもとに，$t$ 検定を行ったり，パラメーターの標準誤差や 95％信頼限界を求めることができる[18]．しかしながら，この方法でも分散を過大評価してしまうおそれがある[19-20]．$W_1$ と $W_2$ が独立であることを仮定しているので，ランダムに個体を組にすることと実質上変わらないからである．なお，上記の方法で，パラメーターの標準誤差，95％信頼限界を算出するプログラム（Excel ファイル）が Annals of Botany の Web ページからダウンロードできる（Hunt *et al*. (2002)[18], supplementaly data）．３つめの方法は，RGR に関してのみ使える方法だが，分散分析を用いる方法である[21]．$\ln W$ を従属変数とし，処理（あるいは種など）と時間の２つを独立変数として解析を行い，処理と時間の相互作用が有意かどうかを調べる．有意であれば処理間で RGR

に違いがあるといえる．この方法の場合，測定間隔が一定であることが必要である．一定でない場合は共分散分析（時間を共変量とする）が使えるだろう．

#### 2.b-2.2.2 Functional (polynominal, dynamic) approach

各測定で得た $W$，$A$，$W_L$ の測定値を時間 $t$ の多項式などの関数で回帰し，そこから成長解析の各パラメーターを算出する方法である[4),22)]．例えば，$Y=b_0+b_1X+b_2X^2+\ldots+b_nX^n$ にて $Y=\ln W$，$X=t$ として回帰を行い，回帰式を $X(=t)$ で微分すると RGR の式が得られる．その他のパラメーターについても容易に求まる（表1）．回帰式ではステップワイズ法を用いて有意になる項を選択する[23)]．また回帰式の統計値をもとに各パラメーターの 95%信頼限界を求めることができる．関数としては多項式がよく使われ，その他にも様々な関数が使われたが，リチャーズ関数やスプライン曲線が当てはまりがよいことが示されている[24–25)]．

functional approach の利点は，上記の classical approach の問題が回避できることである．また，期間平均を求める classical approach と異なり，ある時点のパラメーター値を知ることができるという利点もある．一方で問題もある．一つは，多項式を用いる場合であるが．なかなか測定期間全てにわたって満足に回帰できないという点である．次数の選択が難しく，次数が低いとデータの傾向に比べて単純すぎ（underfitting），高いと特に曲線の両端付近で大きくはずれ(overfitting)，その結果 RGR や NAR が深刻にずれる[26)]．しかしこのような問題はリチャーズ関数やスプライン曲線を使うことで解決するかもしれない．もう一つの問題は，回帰式による Y の予測値の 95%信頼限界は，$X(=t)$ の平均値付近では狭いが両端に近づくにしたがって広がることである[21)]．このため測定期間の初めや終わり付近では，95%信頼限界の範囲が広くなってしまい，統計学的な違いが検出されにくくなる．

### 2.b-2.3 実験デザイン

classical approach と functional approach のどちらを用いるかによって，適切な実験デザインは異なる．classical approach で，破壊測定を行う場合は，測定時の個体サイズのばらつきを抑え，長い測定間隔で，反復個体数を多くとることが重要である[3),24)]．$\ln W_1$，$\ln W_2$ が標準偏差 $\sigma_{\ln W}$ の正規分布に従いサンプル数も同じであると仮定した場合，統計学的定理から求めた classical approach の RGR の標準誤差は以下となる[24)]．

$$s_{\overline{RGR}}=\frac{\sqrt{2}\times\sigma_{\ln W}}{(t_2-t_1)\times\sqrt{n}} \quad (9)$$

$W$ のばらつき（$\sigma_{\ln W}$）が大きかったり，測定間隔（$t_2$-$t_1$）や反復数（$n$）が小さいと RGR の標準誤差が大きくなる．$W$ のばらつきを抑える工夫としては，実験開始前に平均的でない個体をあらかじめ取り除いたり，同じく開始前に小さい個体と大きい個体のサブグループに分けたりすることが行われている[27)]．測定データを得た後に各測定時の最大と最小のデータを除く方法もあるが，統計テストを行うときにその手順を調整しなくてはならない[28)]．測定間隔が短いと誤差が大きくなる理由は，ばらつきのあるデータで 2 点間のスロープを推定するときに間隔が短いほど不正確になることから理解できる．したがってこれらのことから，例えば，ある限られたサンプル個体数で，ある期間の RGR（期間平均）を知りたいときは，測定時点を増やすよりも，減らして（期間の最初と最後の 2 回），一回の反復数を増やした方がよい．測定間隔を短くとる場合は，$W$ のばらつきを小さくするか，反復個体数を多くとることに気をつける必要がある．1 週間以下の測定間隔で反復個体数が 6 というのは明らかに不十分である[24)]．一方，測定間隔を長くとる場合は，NAR などの他のパラメーターの推定に問題が生じる場合がある．$W$ と $A$ などの間に仮定した関係式が実際と違ってくるかもしれないからである．経験的には，葉面積が 2 倍になる期間よりも短い測定間隔であれば，異なる関係式で計算しても NAR の違いは小さい（< 5 %）[3)]．それ以上に測定間隔を長くする場合は，$W$ と $A$ や $W_L$ との関係を把握するために，期間の途中でいくつか個体を刈り取ることが勧められている[24)]．

functional approach では，逆に，一回の反復数は小さくてもよいから，測定間隔を短くし測定回数を増やすのがよい[22)]．一定の測定間隔で一定の反復個体数が望ましい．一般的には，週に 2 − 3 回の頻度で，一回の測定につき 5 −10 個体ずつが適当である．

各測定時点で $W$ のばらつきが小さいことが望ましいことから，成長解析を行うには，コントロールされた均一な生育条件で植物が育つのが望ましい．人工気象室，温室，実験圃場，野外の自然条件，となるにしたがってその条件から離れる．特に野外の自然条件に生育する植物個体の破壊測定による成長解析は難しい[29)]．発芽時期の違いや微環境，生物間相互作用によって，個体サイズや成長速度は個体間で大きく異なる．各測定時にランダムに個体を選ぶとサイズのばらつきは非常に大きいものになるだろう．相互被陰などの結果生育期間中に死亡する個体は破壊測定では把握できないので，RGR を過大評

価するおそれもある．また根などの地下部を回収するのが難しい．

集団の代表値でなく，個々の個体の成長のバリエーションに興味がある場合は，非破壊的な間接測定を行う．植物サイズの間接的な評価については Ondock & Kvet (1971)[30] に詳しい．

## 2.b-2.4 植物体サイズの測定

乾燥重量は，送風乾燥機で重さが変わらなくなるまで乾燥させてから求める．デンプンなどの非構造炭水化物（TNC）が呼吸で失われるのを防ぐためには，凍結乾燥が最もよいが，あまり実際的ではない．酵素を変性させるために乾燥機で最初 60－90 分間 100℃にした後に 70℃にすると，呼吸による損失が凍結乾燥と同程度になる[31-32]．TNC は，最初から 70℃で乾燥させた場合は 25%，室温（27℃）で乾燥させた場合は 40%減少し得る[31]．乾燥重量の TNC 濃度は，葉では日内変動して最大 10%前後，根や茎，小枝では 30－50%までである[33-34]．乾燥機から取り出した後は，結露を防ぐためすぐデシケーターに移し，そこで冷却する．

葉面積は，自動葉面積計（LI-COR 社，林電工など）や，パーソナルコンピューターと市販のスキャナー，画像解析ソフトのシステムを用いて測定できる．後者では，スキャナーで葉の画像を取り込み，画像解析ソフトでその面積を測る．100 dpi 以上の解像度で画像を取り込めば，自動面積計と同程度の精度で測定できる．画像解析ソフトには，フリーウェアとして，NIH Image（http://rsbweb.nih.gov/nih-image/）や ImagJ（http://rsbweb.nih.gov/ij/），LIA32（http://www.agr.nagoya-u.ac.jp/%7Eshinkan/LIA32/index.html）などが公開されている．

## 2.b-2.5 おわりに

成長解析は考案されてすでに 100 年が過ぎるが，植物の成長の環境応答や種間比較など，研究の最初のステップとして現在もなお頻繁に使われる手法である．比較的近年でも，成長が速い植物（fast-grwoing species）と遅い植物（slow-growing species）の違いをもたらす最も大きな原因が SLA であることや[8),35]，上昇した大気 $CO_2$ 濃度下では，SLA の低下のために成長はわずかしか促進されないことなど[36]，重要な知見を我々にもたらしている．その簡便さと重要性から，これからも使用され続けるであろう．

## 参考文献


1）V. H. Blackman, *Ann. Bot*. **33** (1919) p. 353.
2）C. West, G. E. Briggs, & F. Kidd, *New Phytol*. **19** (1920) p.200.
3）G. C. Evans, The Quantitative Analysis of Plant Growth, Oxford, Blackwell Scientific Publications, 1972.
4）D. R. Causton & J. C. Venus, The Biometry of Plant Growth, London, Edward Arnold, 1981.
5）R. Hunt, Basic growth analysis, London, Unwin Hyman, 1990.
6）F. T. Ledig, Proceeding of the Third North American Forest Biology Workshop, eds C. P. P. Reid & G. H. Fechner, Fort Collins, Colorado State University, 1974, p.166.
7）D. G. Brand, G. F. Weetman, & P. Rehsler, *Ann. Bot*. **59** (1987) p.45.
8）H. Poorter & A. Van der Werf, Inherent Variation in Plant Growth: Physiological Mechanisms and Ecological Consequences, eds H. Lambers, H. Poorter, & M. M. I Van Vuren, Leiden, Backhuys Publishers, 1998, p.309.
9）P. B. Reich, M. B. Walters, & D. S. Ellsworth, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **94** (1997) p.13730.
10）P. G. Jarvis, *HortSci*. **20** (1985) p.812.
11）A. J. Vernon & J. C. S. Allison, *Nature* **200** (1963) p.814.
12）A. P. Hughes & P. R. Freeman, *J. Appl. Ecol*. **4** (1967) p.553.
13）H. Poorter, *Physiol. Plant*. **75** (1989) p.237.
14）W. A. Hoffmann & H. Poorter, *Ann. Bot*. **80** (2002) p. 37.
15）P. J. Radford, *Crop Sci*. **7** (1967) p.171.
16）J. Kvet, J. P. Ondok, J. Necas, & P. G. Jarvis, Plant Photosynthetic Production: Manual of Methods, eds Z. Sestak, J. Catsky, & P. G. Jarvis, The Hague, Dr W. J. Junk Publisher, 1971, p.343.
17）J. C. Venus & D. R. Causton, *Ann. Bot*. **43** (1979) p.633.
18）R. Hunt, D. R. Causton, B. Shipley, & A. P. Askew, *Ann. Bot*. **90** (2002) p.485.
19）D. R. Causton, *Ann. Bot*. **67** (1991) p.137.
20）D. R. Causton, *Ann. Bot*. **74** (1994) p.513.
21）H. Poorter & C. Lewis, *Physiol. Plant*. **67** (1986) p.223.
22）R. Hunt, Plant Growth Curves: The Functional Approach to Plant Growth Analysis, London, Edward Arnold, 1982.
23）R. Hunt & I. T. Parsons, *J. Appl. Ecol*. **11** (1974) p.297.
24）H. Poorter & E. Garnier, *J. Exp. Bot*. **302** (1996) p.1343.
25）B. Shipley & R. Hunt, *Ann. Bot*. **78** (1996) p.569.
26）A. D. Nicholls & D. M. Calder, *New Phytol*. **72** (1973) p. 571.
27）D. M. Whale, H. Heilmeier, & H. Milbrodt, *Ann. Bot*. **56** (1985) p.631.
28）V. Barnett & T. Lewis, Outliers in Statistical Data,

Chichester, Wiley and Sons, 1978.
29) N. R. Chiariello, H. A. Mooney, & K. Williams, Plant Physiological Ecology: Field Methods and Instrumentation, eds R. W. Pearcy, J. Ehleringer, H. A. Mooney, & P. W. Rundel, London, Chapman and Hall, 1989, p.327.
30) J. P. Ondock & J. Kvet, Plant Photosynthetic Production: Manual of Methods, eds Z. Sestak, J. Catsky, & P. G. Jarvis, The Hague, Dr W. J. Junk Publisher, 1971, p. 392.
31) C. A. Raguse & D. Smith, *J. Agri. Food Chem*. **13** (1965) p.306.
32) D. Smith, Removing and Analyzing Total Non-structural Carbohydrates from Plant Tissue, Madison, Research Division, College of Agricultural and Life Sciences, University of Wisconsin, Research Report 41, 1969.
33) H. A. Mooney & W. D. Billings, *Am. J. Bot*. **47** (1960) p.594
34) H. A. Mooney & B. Bartholomew, *Bot. Gaz*. **135** (1974) p.306
35) H. Lambers & H. Poorter, *Adv. Ecol. Res*. **23** (1992) p. 187
36) H. Poorter & M. L. Navas, *New Phytol*. **157** (2003) p. 175

# 2．個体から群落スケールの $CO_2$ ガス交換
## b．群落の物質生産
### b-3．森林生態系の純一次生産量の測定手法

大塚　俊之[1)]

森林生態系において，植物の成長と枯死を野外でどのように定量的に測定するのか，また渦相関法によるタワーフラックス観測との連携を視野に入れて，生態学的な方法にどのような問題点があるのかについて整理した．

## Measuring Net Primary Production in Forest Ecosystems

Toshiyuki Ohtsuka

Net primary production (NPP) is defined as the total new organic matter produced during a specified interval. I examine how forest NPP can be estimated based on field measurements, and how field NPP measurements can be used to complement eddy covariance based studies of whole-forest $CO_2$ flux.

目次

2.b-3.1　はじめに
2.b-3.2　野外での純一次生産量の推定
2.b-3.2.1　地上部の NPP*
2.b-3.2.1.1　地上部の林分増加量
2.b-3.2.1.2　地上部の損失量
2.b-3.2.1.2.1　リターフォール
2.b-3.2.1.2.2　その他の損失量
2.b-3.2.2　地下部の NPP*
2.b-3.2.2.1　太根の純生産量
2.b-3.2.2.2　細根の純生産量
2.b-3.2.2.3　地下部でのその他の損失量
2.b-3.2.3　非構造的炭水化物の蓄積
2.b-3.3　NPP と森林全体のフラックス測定とのリンク
引用文献

### 2.b-3.1　はじめに

IPCC の第三次報告書によると[1)]，地球全体の陸上生態系の炭素シンクとしての機能は，1980 年代（0.2 PgC $yr^{-1}$ の吸収）に比べて 1990 年代（1.4 PgC $yr^{-1}$ の吸収）に入って大幅に増大した．これは主に気候変動にその要因があると考えられており[2)]，気候変動に伴って陸上生態系の生態系純生産量（Net ecosystem production：NEP）がどのように変化するかを理解することは，地球規模での炭素循環に対する陸上生態系の役割を知る上で非常に重要である．

1）岐阜大学流域圏科学研究センター

陸上生態系の炭素吸収は生産者の光合成の結果であり，葉や植物体の正味の光合成量を土地面積あたりで表す場合には，これを純一次生産（Net primary production：NPP）と呼ぶ．1960 年代から 70 年代の初めにかけて，陸上生態系だけでなく，海洋・湖沼などの地球上の様々な場所で NPP の測定に対して強い関心が持たれ，その定量化が行われた[3)]．これは「人類の福祉と生産力の生物学的基礎」をその総括的な研究課題とする国際生物学事業計画（略称 IBP）の実施と密接に関係していた．日本でもこの時代に，様々な陸上生態系の物質生産に関する膨大なデータの蓄積がある[4)]．その後やや下火になった物質生産の研究は，1990 年に IPCC 第一次報告書[5)] が提出されてから，再びその重要性を増してきた．この報告書では化石燃料の使用によって大気中に放出される $CO_2$ の約 30％が行方不明とされた．このミッシング・シンクの探索のために，微気象学的な渦相関法に基づく，陸上生態系と大気の $CO_2$ 交換量（Net ecosystem exchange：NEE）ついての研究（2.b-4. 参照）が 1990 年代に入ってから爆発的に発展した[6,7)]．陸上生態系の中でも草原生態系は，一般的に一年以内にすべての地上部が枯死する，放牧を含む消費者による被食量が大きいなど，森林生態系とは大きく異なった特徴を持つ[8)]．そのため，本稿では森林生態系の NPP の測定手法について取り扱う．特に森林生態系において，植物の成長と枯死を野外でどのように定量的に測定するのか，また渦相関法によるタワーフラックス観測との連携を視野に入れて，生態学的な手法にどのような問題点があるかについて整

理する．

## 2.b-3.2　野外での純一次生産量の推定

純一次生産（NPP）とは，単位面積当たりの真の光合成速度の総量（総生産，Gross primary production：GPP）から呼吸速度を差し引いたものである．しかしながら，森林生態系において野外で両者を測定し，この差異から NPP を求めることは現段階では不可能である．野外で森林の GPP を直接的に求めることは難しく，また生産者の呼吸量の生態系レベルでの総量を求めることにもいまだに相当の不確実性がある．このため野外で測定する場合には，「ある特定の期間内に新たに生産された有機物の総量」と NPP を定義する．この NPP の構成要素を概念的に整理することは比較的簡単である（図 1a）[9]．しかしながら，実際には測定期間内にそれぞれのプールからの移動（被植，分解，死亡，転流など）があるため，ある期間内に生産された有機物量をすべての構成要素において直接的に測定することは不可能である．このため NPP の野外での実際の推定は，様々な仮定をおいた上で，構成要素のうちのいくつかの測定に基づいたものとなる．Clark et al.[9] は，NPP（期間内に生産されたすべての有機物）の真値に対して，野外での測定に基づく操作上の推定値を NPP* として定義した（図 1b）．NPP* はある期間内における，図 1b に含まれるすべての構成要素の合計であり，基本的には以下の二つからなる．

1）生きた植物によって，ある期間の終わりに保持されている新しい有機物の総量
2）同じ期間にその植物によって生産されて失われた有機物の総量

NPP* の精度（どこまで NPP に近づけるか）は，どれだけの構成要素をどれだけの精度で測定できるかにかかっているが，森林生態系ですべての構成要素を野外で測定することは，現状ではほぼ不可能である．図 1b の構成要素の中で，地上部のバイオマス純増加量とリターフォールの二つの要素を測定することが一般的には一番多く，両者の和が地上部 NPP（ANPP）とみなされる．地下部の NPP は無視されるか，地上部との理論的な比率から計算される場合が多いが，実際には非常に大きな値であり，その推定は NPP* の精度に大きく影響する．NPP* のすべての構成要素（特に地下部の要素）に対して，正確な推定のための実際的あるいは理論的な挑戦が現在でも続いており，今現在行われている方法について具体的な調査例を紹介しながら解説する．

### 2.b-3.2.1　地上部の NPP*

#### 2.b-3.2.1.1　地上部の林分増加量

地上部の林分増加量は，永久方形区を用いてある間隔

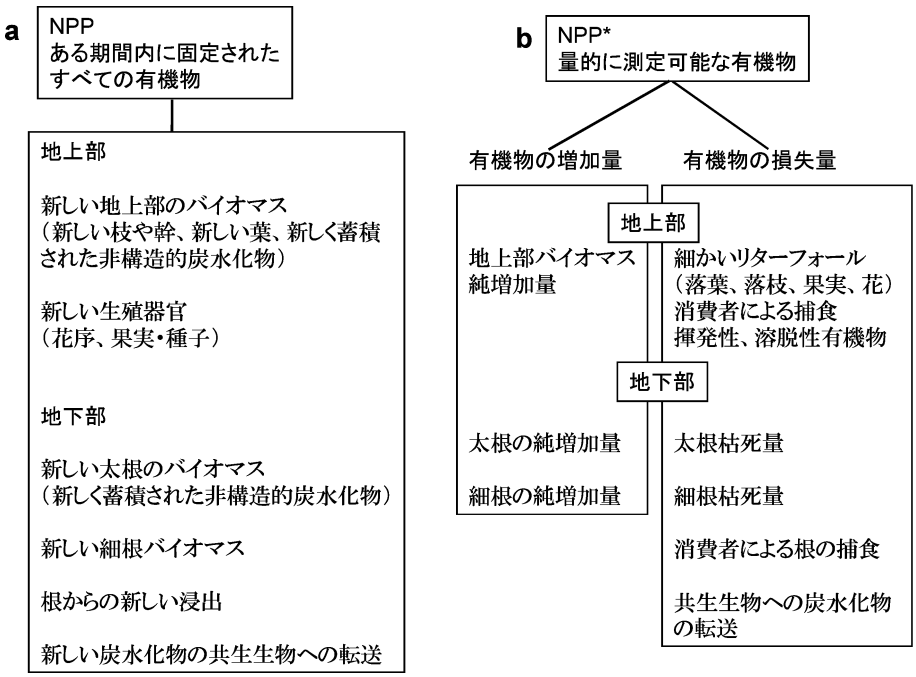



**図 1**：Clark et al.[9] によって定義された，森林生態系における NPP（a，期間内に生産されたすべての有機物）と，野外での測定に基づく操作上の推定値である NPP*（b）の構成要素．NPP* はある期間内におけるすべての構成要素の合計であり，生きた植物によって，ある期間の終わりに保持されている新しい有機物の総量と，同じ期間にその植物によって生産されて失われた有機物の総量の二つの部分からなる．Clark et al[9] から改訂．

(通常は1年以上)をおいて森林のバイオマスを2回以上推定することによって評価することになる．年輪が形成される温帯や亜寒帯の森林生態系では，樹幹解析や年輪解析などによって複数のサンプル木の過去の成長を推定して，1回の毎木調査から林分全体の地上部バイオマスの増加量を推定する方法も従来用いられてきた（木村に詳しい）[10]．Ohtsuka et al.[11]は，岐阜大学・流域圏科学研究センターのカンバとミズナラを中心とする冷温帯落葉広葉樹林（高山サイト）において，地上部の林分増加量を評価する方法を比較検討した．高山サイトでは複数の種が優占しており，少数のサンプル木では種特異的な成長パターンを評価できないこと，1回の調査では過去の枯死木を評価できないことなどの理由から樹幹解析や年輪解析の方法は，自然の二次林では適さないことを報告している．後述するように生態系のNEPを評価するための森林全体のフラックス測定との連携を考えた場合には，温帯の森林でも永久方形区を用いて生残と成長の調査を継続的に行なうことが不可欠である．

森林内に永久方形区を設置して全個体（幹）についての毎木調査を行なった場合，森林全体の地上部バイオマスは，胸高直径（DBH）と樹木の乾燥重量との相対成長関係式から推定することになる．サイト特異的な相対成長式をつくることはバイオマスの推定において最も重要なプロセスの一つである．高山サイトでは，方形区周辺から24本のサンプル木を伐採して相対成長関係式を作成した(図2)．この調査では24本のうち，7本については地下部の主要な太根も掘り出して乾燥重量を求め，DBHと太根のバイオマスの相対成長関係式も求めている．これは後述する太根のNPPの推定に用いることが出来る．

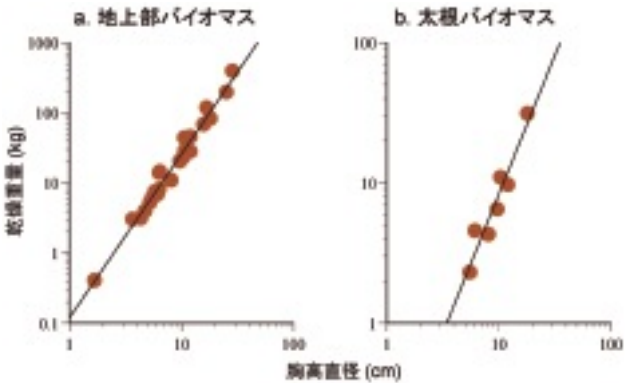



**図2**：高山サイトによる，サンプル木の胸高直径(DBH，cm)と乾燥重量（kg）との間の相対成長関係．この調査では毎木調査のための永久方形区周辺から24本のサンプル木を伐採して，胸高直径と地上部幹枝バイオマス(葉のバイオマスは含まれていない）との相対成長関係を求めた（a)．また24本のうち，7本については地下部の主要な太根も掘り出して，DBHと太根のバイオマスの相対成長関係式も求めた（b)．

$$\log W_a = 2.334 \log D - 0.946 \quad (r^2 = 0.98,\ n = 24) \quad (1)$$

$$\log W_r = 1.977 \log D - 1.074 \quad (r^2 = 0.92,\ n = 7) \quad (2)$$

$W_a$：地上部乾燥重量(kg葉を除く)，$W_r$：太根の乾燥重量（kg)，D：胸高直径（cm)

最大直径に相当するような大径木をサンプリングすることはバイオマス推定において非常に重要であるが，現実的にはこのようなサンプルの処理は極端に労力がかかる．なお図2の地上部バイオマスには葉の重さは含まれていないことに注意する必要がある．落葉樹林では，必ず葉の量を除いた相対成長関係式を用いてバイオマスを推定する．なぜなら，後述するようにリタートラップによる枯死・脱落量と地上部バイオマスの増加量とで，葉の生産量を2回加えてしまう可能性があるからである．

永久方形区内のすべての樹木の直径を，ある期間をおいて2回以上測定すれば，林分増加量の推定が可能となる．ただし，稚樹等を含めてすべての個体を調査することは労力がかかるので，直径成長を測定する最小サイズを設定することが多い．最小の直径サイズは，そのサイトの樹木の密度やサイズクラスなどの群落構造に依存するが，高山サイトではDBH≧5 cmの成長を測定している．この森林では，樹高が1.3 m以上で直径が5 cm以下の幹数密度は方形区全体の25%以上を占めるが，年間の地上部の林分増加量としての寄与は5％以下であった[11]．また，実際の樹木の成長は年に数mm程度であり(図3)[12]，直径の測定には最新の注意が必要である．野外の測定では枯死していない個体でも直径成長がマイナスになる場合がある．樹勢の弱った個体では，実際に直径が減少する場合もあるが，測定位置や測定者の癖などにも注意する必要があるだろう．少なくとも，測定場所の幹周囲をペンキ等で丁寧にマーキングした上で，適切な測定時期を選定すること，また測定誤差を少なくするために金属製でなるべく幅の狭いメジャーを使うほうが良い．

永久方形区を用いた毎木調査と，相対成長関係式を用いた地上部の林分増加量の推定には二つのアプローチがある(図4)[9]．樹木の枯死と新規加入(期間内に成長して最小直径に到達する個体）についての扱いが異なっているが，二つのアプローチは基本的に同じものである．アプローチ1ではすべての個体の生残と成長を追っており，それぞれの個体の測定期間の最初（$t_1$）と最後（$t_2$）のバイオマス推定値の差によって各個体の成長を計算する．これは期間内に生存していた，すべての個体の成長量の合計である．期間内に死亡する個体がある場合，そ

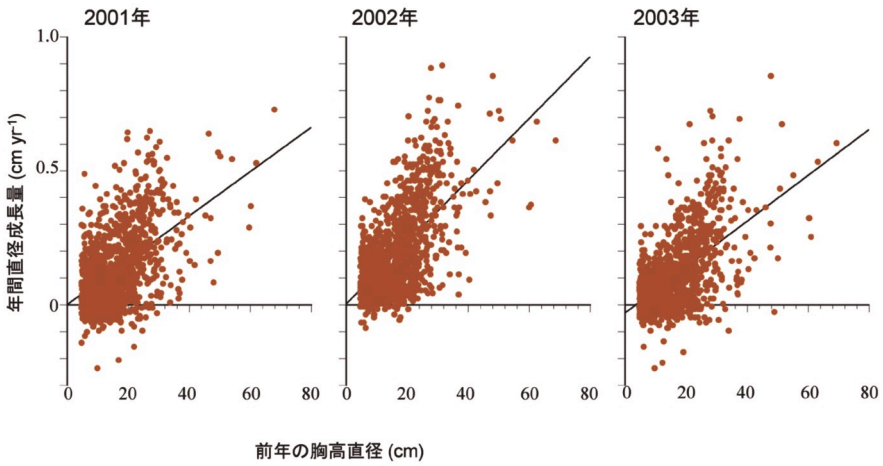
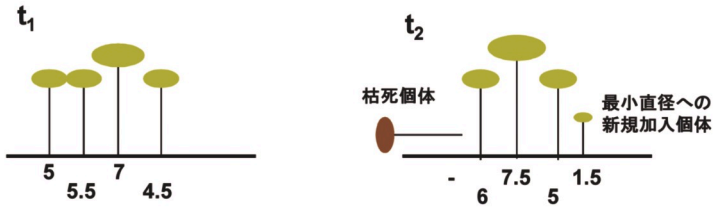



**図 3**：高山サイトでの永久方形区内における DBH 5 cm 以上のすべての幹の成長調査の例．2001 年から 2003 年までの 3 年間の調査を，前年の DBH（cm）と一年間の直径成長量（cm $yr^{-1}$）の相関として示している．




**アプローチ1：**
**林分増加量 = (Σ生存個体の成長量) + (新規加入個体の増加量)**
**= ((6 - 5.5) + (7.5 - 7) + (5 - 4.5)) + (1.5 – 1)**
**= ( 0.5 + 0.5 + 0.5 ) + (0.5) = 2.0**

**アプローチ2：**
**林分増加量 = ($t_2$バイオマス – $t_1$バイオマス) + (Σ調査期間内の枯死個体のネクロマス)**
**- (最小サイズ個体のバイオマス × 新規加入個体数)**
**= ((6 + 7.5 + 5 + 1.5) - (5 + 5.5 + 7 + 4.5)) + (5) – (1)**
**= ( 20 – 22 ) + (5) - (1) = 2.0**

**図 4**：永久方形区を用いた 2 回以上の調査による，地上部の林分増加量を計算するための二つの方法．アプローチ 1 は生きているすべての個体の追跡に基づいている．アプローチ 2 はそれぞれの調査期間でのバイオマス測定に基づいているが，期間内に死亡した個体と，最小サイズに加入してきた個体の調査が必要である．Clark et al[9] から改訂．

の個体は期間内の増分は 0 とみなし増加量の計算には入れていない．また新規加入の評価も必要である．新規加入個体の調査期間前のバイオマスは最小サイズ（例えば DBH＝5 cm）の樹木バイオマスと等しいとみなし，それと期間後のバイオマスとの差異を成長量とみなして，全個体の成長量の合計に加える．

アプローチ 2 では，各個体の成長を追うのではなく，期間の最後（$t_2$）のバイオマスから期間の最初（$t_1$）のバイオマスを差し引き，樹木の枯死と新規加入による補正を行う．枯死の補正は，期間中に死んだ個体のネクロマスを期間の最初のバイオマスと等しいと仮定し，バイオマスの純変化に足してやる．さらに新規加入の補正のために，新規加入の個体数と最小直径の個体バイオマスをかけて，これをバイオマス増分から減じることになる．

アプローチ 2 は 10 年以上たって方形区を再調査するような，調査間隔が長い場合に良く用いられる．しかし，調査期間が長いと期間内の枯死個体の評価が難しく，特に大径木個体が死んだ場合には期間内の成長量が考慮できないのでバイオマス増分は過小評価となる．

### 2.b-3.2.1.2　地上部の損失量

植物に新しいバイオマスが蓄積するのに加えて，期間内に生産された有機物の一部は枯れたり食べられたりして失われていく．このような損失には葉や花，実，生物起源の揮発性有機物，根から浸出する有機物など様々なものがある．地上部の NPP* の推定にはこれらの損失分の評価が必要である．

#### 2.b-3.2.1.2.1　リターフォール

植物器官の一部（葉や花，小枝など）は寿命が短いの

で，調査期間内に生産されたものが，調査終了までの間に枯死したり脱落したりすることがある．このような枯死・脱落した植物器官はリターフォールと呼ばれ，一般的にリタートラップ法を用いて野外で測定される．リタートラップとは，面積が 1 m² 程度のネット状のカゴを方形区内に複数個設置し，主に林冠から落ちてくる細かなリターフォールをサンプリングするものである．リタートラップ内に溜まったリターは，通常月に 1 度回収して器官ごとに分けた後，乾燥重量を測定する．

リタートラップを使って推定すべきものは，測定期間内に作られた有機物の枯死・脱落量であるが，実際にはその推定は難しい．完全な落葉樹林の場合には，調査期間を一年間とすれば，期間内に新しく生産された葉は測定期間中に必ず枯れ落ちるので，リタートラップにより得られた葉の損失量は年間の葉の生産量と等しい．一方で常緑樹の場合には，リタートラップによる年間の葉の枯死・脱落量は測定期間とそれ以前の生産を含んでいるが，両者を区別することは現実的には難しい．測定期間前と測定期間後の生きている樹木の葉量の差異は，測定期間中における新しい葉の生産と，新しい葉と古い葉の損失の結果である．従って，葉の量が定常状態であると仮定したマスバランスによって，年間の枯死・脱落量をそのまま NPP* に含める場合が多い．

一方で，枝などの木質リターの扱いも難しい．一般的には，木質リターは測定期間以前の生産物である場合が多いので，リタートラップからは除くべきである．しかし，かなりの木質リターが測定期間内に脱落し，相対成長関係式がそのような脱落を含んだ代表的なサンプル木で作成されているとすれば，このような脱落量を測定期間後のバイオマスに加えないと成長量が過小評価になる．この場合，比較的大きな枝の脱落量は空間的に非常に不均一である場合が多いので，リタートラップ法だけでは精度良い推定は難しい．そこで，方形区内に数 m 四方程度の面積をいくつか区切り，いったんきれいに枝を取り払った後に，そこに新しく落ちてきた枝をきれいに回収する方法（枝トラップ法）が併用される．このような枝の枯死・脱落は，空間的な不均質性だけでなく年変動も大きいので，野外では 5 －10 年程度の平均値を補正値として用いるべきである．

図 5 はアカマツ林でのリタートラップによる細かなリターフォール量 (a) と，枝トラップによる木質リター量 (b) を示したものである．アカマツは常緑樹であるが，落葉期は秋にあって，ほとんどの葉が 10 月に落葉する．また雪の影響などで冬の間に小枝や樹皮などの多くの木質リターが落ちることがわかっており，冬季の間のリター量も無視できない．また，枯死・脱落量の推定精度はリタートラップ間の分散が大きい場合には，リタートラップの数にも大きく影響を受ける．リタートラップの数の問題を評価した研究は少ないが，理想的には分散の定量的評価のための予備調査を基にして，そのサイトで必要なトラップ数を決定する必要があるだろう．ただし閉鎖した林分内では 6 － 7 個以上あれば十分という意見もある[13]．また枝トラップの小区画の合計面積は，少なくとも調査林分の面積の 10%を超えることが望ましいとされる[10]．

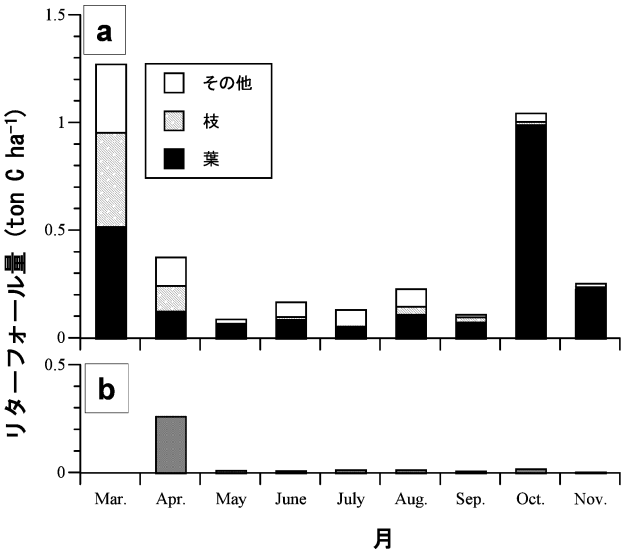



図 5：リタートラップ法による細かなリター（a）と，林床に設置した枝トラップ法による木質リター（b）の 1 年間の枯死・脱落量を示す．両者共に基本的に月に一度回収しているが，積雪の影響によりリタートラップでは 12 月～ 3 月までの 4 ヶ月分を，枝トラップでは 12 月～ 4 月までの 5 ヶ月分をまとめて回収している．

### 2.b-3.2.1.2.2　その他の損失

地上部の生産量は消費者によってかなりの損失を被る場合があるが，森林生態系の NPP* の推定において，消費者による被食量を考慮したものは比較的少ない．これは，健全な森林では消費者による捕食は比較的小さいと考えられているからである[14,15]．しかし，調査が長期的になると昆虫の大発生などが起こる場合があり，今後検討していかなければならない課題である．生物起源の揮発性有機物や地上部の植物体からの溶脱を NPP* に組み込んでいる研究はさらに少ない．これらについては，野外での定量的な測定手法についてはほとんど検討されていない．

### 2.b-3.2.2　地下部の NPP*

森林における地下部の NPP* は手法的な難しさのために，いまだに残された課題が非常に多く，その理解が

進んでいない．図 1b にあるように，地下部の NPP* はいくつかの構成要素からなるが，現状では便宜的に樹木の根を太根と細根に区別する必要がある．両者は生物学的な活性が異なり，特に根の成長と枯死によって起こるターンオーバータイムも大きく異なるからである．ただし，細根の定義は直径 2 mm 以下，5 mm 以下など，対象とする林分の組成や研究手法などによって異なる[16]．

#### 2.b-3.2.2.1　太根の純生産量

仕事量としては非常に大変だが，サンプル木の太根を掘り出すことによって，樹木の胸高直径と太根の乾燥重量は相対成長関係式で示せる場合が多い（図 2b）．この相対成長関係式を用いれば，永久方形区を用いた 2 回以上の毎木調査による成長と生残の調査によって，地上部バイオマスのアプローチと同様に太根の NPP（枯死量と純増加量）を推定することが出来る．

Clark et al.[9] は，この方法の問題点として，一般的に太根に分類される根の中でも比較的細い根（2 −10 mm 程度の根）の生産量が，相対成長関係式では評価されない点を述べている．相対成長式を作るための根のサンプリングは重機などを用いて行う場合も多く，不完全なサンプリングや物理的な破壊によって 2 −10 mm 程度の根は失われて，太根の乾燥重量には含まれないからである．

#### 2.b-3.2.2.2　細根の純生産量

細根 NPP の測定のためには，NPP* の他の構成要素と同様に，測定期間内の細根の純増加量と，期間内の枯死量を評価する必要がある．生態系レベルでの細根 NPP は，野外での森林 NPP* の推定において，現在残されている課題のうちで最重要なものの一つであろう[17]．生態系レベルでの森林の細根純生産量の測定手法は Vogt et al.[18] にまとめられており，間接的な手法と野外で直接的に根を測定する手法がある．間接的な手法としては，生態系の土壌呼吸量を測定することによって，炭素のマスバランス（従属栄養生物による土壌圏炭素（SOM）の分解呼吸量と SOM への植物からの炭素の供給量とが等しいと仮定する）から地下部の NPP を推定する方法が良く用いられている[19]．しかし，土壌呼吸における根の呼吸量の割合の推定が難しく，また SOM が定常状態であるという仮定に問題がある場合も多い[20]．

直接的な方法としては，コアを用いて野外で細根をサンプリングする方法が従来から用いられてきた．これには，月に一度など定期的に土壌中からコアをサンプリングして細根量の変化を推定する連続コアサンプリング法と，ネット状のコアを土壌に空けた穴に埋めて，その中に伸張してくる細根を定量化するイングロウスコア法が知られている[21]．しかしながら，細根の量と分布の時間的・空間的な変動性のために，これらの方法を用いた細根 NPP の推定には不確実性が非常に高い．そのため近年では，土壌中の細根の動態をカメラを用いて直接的に観察するミニライゾトロン法によるデータが森林生態系においても増加してきた[22]．例えば，高山サイトでは，細根のバイオマスは 1.6 tC $ha^{-1}$ で，樹木バイオマス全体のわずか 2 %に過ぎない．しかしミニライゾトロン法で調べた細根 NPP は 1.8 tC $ha^{-1}y^{-1}$ にものぼり，樹木 NPP（5.4 tC $ha^{-1}y^{-1}$）の 30%以上の寄与となった．このことからも細根 NPP は森林の NPP* を推定する上で不可欠であり，その推定方法が NPP* の精度に大きく影響することになる．ミニライゾトロン法を中心とした細根 NPP の野外での研究手法については，里村ら[21] に非常に詳しくまとめられており，本稿では詳細は触れない．

ミニライゾトロン法は細根 NPP の測定手法として標準的な手法となりつつあるが，機材が高価であること，画像データの解析に長い時間がかかることなど，いまだに問題点もある．また最近の報告では，ミニライゾトロン法の観測開始直後は，土壌撹乱のために細根のターンオーバタイムを短く評価してしまう傾向があることが報告されている[17]．これは，今までの研究結果のほとんどが，細根 NPP を過大評価している可能性を意味する．また，ミニライゾトロン法と比べて，$^{13}C$ や $^{14}C$ などの炭素同位体を用いた非破壊的な細根動態の研究ではターンオーバータイムの推定値が長い傾向があることも知られている[23,24]．このように森林生態系の細根 NPP については，その測定手法の標準化を含めて，現在まさに活発な議論が行われている状況にある．

#### 2.b-3.2.2.3　地下部でのその他の損失量

生きた根から土壌中への浸出物（根圏リゾデポジション）[25] や，菌根菌への有機物の移動，消費者による根の捕食など根の枯死以外の地下部での損失量は，森林生態系の NPP* ではほとんど考慮されてこなかった．しかし，近年の研究では全 NPP のかなり大きな部分を占めるとの指摘もある．Norton et al.[26] は，マツの実生において新しく固定した炭素の菌根菌への再分配量は 30%以上もあることを指摘した．また Bekku et al.[27] は，雑草群落ではあるが根からの浸出量は NPP の 3 −13%を占めると述べている．炭素同位体ラベリングを用いた根茎からの炭素の損失量の研究は増えてきているが[28]，生態系レベルでの研究のためには，まだ今後の発展が必要である．

#### 2.b-3.2.3　非構造的炭水化物の蓄積

NPP の一部は，非構造的炭水化物の形で樹木の地上

部や地下部に蓄えられる．この蓄積量の変動はNPPの推定に大きな影響を与えると考えられているが，森林生態系において野外でこの問題を扱った研究はまだ見られない．しかし，微気象学的なフラックス測定が行われているサイトでは，炭素のマスバランスから，この蓄積量が注目されている場合がある．例えば，Shibistova et al.[29]は，マツ林において地上部の樹木生産量は森林全体のNPPのわずかに25%に過ぎず，渦相関法により推定したGPPの年変動が樹木の成長量と全く相関が無いことを見出した．彼らは，翌年以降の新しい植物体の生産に必要な炭水化物の需要によって非構造的炭水化物の蓄積が増加し，このために当年の樹木成長量とGPPの相関が無い可能性を指摘している．またGough et al.[30]は，ミシガン州の落葉混交林において，ある年のNPPは，渦相関法によるその前年のNEEと相関があることを見出した．これは，その年に固定した炭素の一部がその年の成長よりも，むしろ翌年の成長のために蓄積されるからではないかと述べている．このようにタワーフラックス観測と野外でのNPP*の測定をリンクさせたデータ解析によって，非構造的な炭水化物の動態についての知見が今後増えてくる可能性がある．

## 2.b-3.3　NPPと森林全体のフラックス測定とのリンク

1990年代以降，微気象学的な渦相関法を用いた，生態系と大気の炭素交換（NEE）に関する研究は爆発的に増加している[31,32]．近年ではNEEの年々変動に関する研究も増加しており[33,34,35]，温帯地域の森林生態系の炭素シンクとしての機能や，NEPの変動に対するGPPと生態系呼吸（RE）の寄与などが評価されるようになった．一方で，NEPは生態系内の二つの生物学的プロセスのバランス―独立栄養生物の光合成生産（NPP）と従属栄養生物の呼吸量（Rh）―によって決定されている．森林生態系では従属栄養生物の分解呼吸（Rh）は主に土壌圏で起こり，チャンバーシステムを利用した土壌呼吸の測定が行われてきた[36,37]．土壌呼吸の測定手法については，莫・関川[38]や木部・鞠子[39]を参照のこと．野外でのNPP*の推定と合わせて，土壌呼吸の測定によってRhを推定しNEPを評価する方法は，微気象学的な渦相関法に対してBiometric法と呼ばれる[40]．

$$\text{Biometric NEP} = \text{NPP} - \text{Rh} \qquad (3)$$

上述したように，森林NPPの推定には必ずしも十分な精度が補償されていない．多くのフラックスの中の一つの変化（例えば細根の枯死量）でもbiometric NEPの推定に大きな誤差をもたらす．また土壌呼吸によるRhの推定は，1）根の呼吸量の推定が難しい，2）森林に多く見られる倒木などの大型木質リター（CWD）の呼吸量を含んでいない，3）地形的なスケールアップの問題などにより，これも十分な精度が得られているとは言いがたい．しかし，渦相関法による推定にもいまだに多くの問題があり（2.b-4. 参照），これらの二つの手法の比較はクロスチェックのために非常に重要である．近年になって，渦相関法とbiometric法によるNEPの比較について先駆的な研究がいくつかある[20,40,41,42]．

Ohtsuka et al.[20]は，5年間（1999－2003）の平均値として高山サイトでのbiometric NEPを推定した（図6）．地下部の太根のNPPと地上部幹枝のNPPは，図4のアプローチから計算し，細根NPPを含めた樹木NPPは5.4 tC ha$^{-1}$y$^{-1}$と推定された．また高山サイトでは林床が密なササ群落に覆われており，その林床ササNPPが1.1 tC ha$^{-1}$y$^{-1}$と推定された[43]．高山サイトでは，土壌呼吸の連続測定も行われており[37]，地形補正を行った年間土壌呼吸量が7.1 tC ha$^{-1}$y$^{-1}$，CWD分解を含めたRhは4.4 tC ha$^{-1}$y$^{-1}$と推定された．これらの結果から

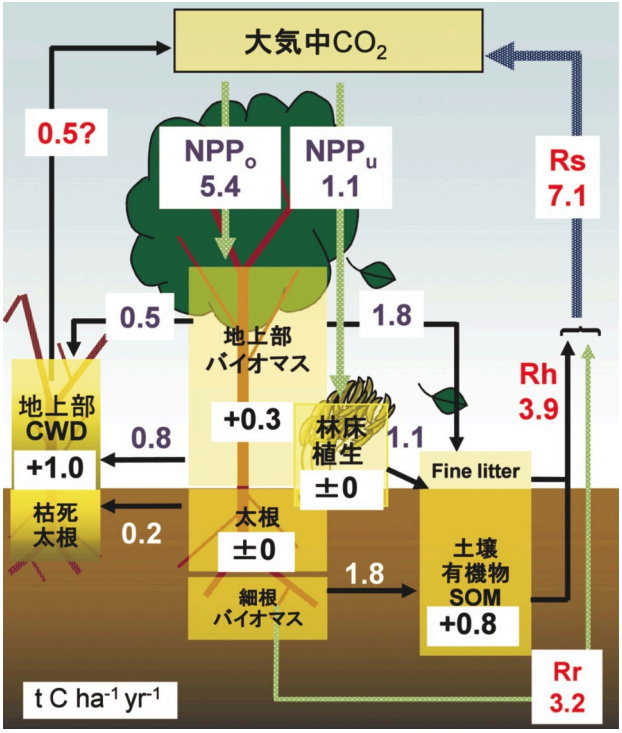



図6：高山サイトでの炭素循環のコンパートメントモデル．□は生態系内の炭素プールを示し，1年間の収支を数値で示している（1999年から2003年までの5年間の平均値）．矢印は各プール間の炭素フラックスを示し，1 ha当たりでの1年間の移動量を示している．

biometric NEP は 2.1 tC $ha^{-1}y^{-1}$（5.4＋1.1－4.4）となった．Saigusa et al.[35] は，高山サイトで渦相関法による NEP の年変動を報告しているが，同じ 5 年間の渦相関法による平均値は 2.77 tC $ha^{-1}y^{-1}$ と biometric 法とおおよそ近い値になった．NPP* の構成要素を，すべてのサイトで同じように精度良く推定することは，現状では非常に難しい．従って単年の推定値で Biometric 法と渦相関法の NEP の絶対値を比較することはあまり意味が無い．しかしながら，複数年の平均値の Biometric 法と渦相関法の比較は，両方の方法の信頼性を高める結果となり，生態系の NEP の推定精度を上げるために重要なテーマである．

一方で NPP* の中でも，現状では複数年の平均値としてしか評価できない要素と，比較的精度良く年変動をとらえられる要素があることをきちんと理解することは重要である．Ohtsuka et al.[12] は biometric NEP の年変動を推定するために，NPP* の構成要素のうち，年々変動を比較的精度よく推定できる要素（リタートラップによる葉 NPP と毎木調査による木部 NPP）とそれ以外の主要な要素（細根 NPP やササ NPP など）を区別した．その結果，木部 NPP は 0.88 tC $ha^{-1}y^{-1}$ から 1.96 tC $ha^{-1}y^{-1}$ まで大きな年々変動を示したが（表 1），葉 NPP と Rh の変動はこれに比べると小さかった．年間の木部 NPP は渦相関法による NEP と有意な正の相関を示したが，葉 NPP と Rh は NEP と相関が見られなかった．このことから，この生態系の NEP の年変動は，独立栄養生物の NPP の変動（特に木部 NPP）に直接的に関連していることを見出した．

このように野外での NPP の測定のクオリティーコントロールに注意すれば，NPP* と渦相関法の年変動を直接的に比較することも可能となる．タワーフラックス観測サイトでは，土壌呼吸の連続的測定と同時に NPP* の連続的な測定を行うことによって，森林生態系の炭素循環プロセスの年々変動とそれに対する独立栄養生物と従属栄養生物の寄与を評価し，炭素循環プロセスが気候変動にどのように応答するかについての理解を可能にする．地球規模での炭素循環の問題がクローズアップされる中で，様々な生態系で渦相関法による生態系の炭素交換量に関する研究が発展してきた．このような中で，精度の高い NPP* を推定することの重要性がますます増してきている．

## 引用文献


1）IPCC (2001) Climate Change 2001: IPCC Third Assessment Synthesis Report. Cambridge University Press.

2）D. S. Schimel, J. I. House, K. A. Hibbard et al., Nature **414** (2001) P.169.

3）H. Lieth & R. H. Whittaker (1975) Primary productivity of biosphere, Springer.

4）T. Shidei & T. Kira (1977) Primary productivity of Japanese forests- Productivity of terrestrial communities- JIBP Synthesis Vol. 16 University of Tokyo Press, Tokyo.

5）IPCC (1990) IPCC First Assessment Report. Scientific Assessment of Climate change- Report of Working Group I. Cambridge University Press.

6）S. C. Wofsy, M. L. Goulden, J. W. Munger et al., Science **260** (1993) P.1314.

7）S. Yamamoto, S. Murayama, N. Saigusa, H. Kondo, Tellus, **51**B (1999) P.402.

8）「草地科学実験・調査法」日本草地学会編 Ⅶ．草地・施設におけるエネルギー・物質動態のモニタリングと評価に関する調査法（1）23．草地におけるエネルギー・物質動態のモニタリングと評価に関する調査法（板野志郎）

9）D. A. Clark, S. Brown, D. W. Kicklighter, J. Q. Chambers, J. R. Thomlinson, & J. Ni, Ecological Applications


**表 1**：高山サイトにおける 8 年間の森林動態と樹木 NPP の年々変動．1999 年と 2000 年及び，2004 年と 2005 年はそれぞれ 2 年間の平均値として示している．木部 NPP は，地上部の幹枝（葉を除く）生産量と，地下部の太根の生産量を，図 4 に示した方法で推定した．また葉の NPP はリタートラップ法により推定した．樹木 NPP は木部 NPP と葉 NPP を足したものである．

| | 1999–2000 | 2001 | 2002 | 2003 | 2004–2005 | 2006 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 幹数（5 cm≥DBH） | | | | | | |
| 枯死幹数（$ha^{-1}y^{-1}$） | 30 | 54 | 14 | 45 | 18 | 22 |
| 新規加入幹数（$ha^{-1}y^{-1}$） | 5 | 4 | 4 | 5 | 2 | 1 |
| 木部 NPP（ton C $ha^{-1}y^{-1}$） | | | | | | |
| 地上部幹枝 | 0.73 | 1.15 | 1.64 | 1.02 | 1.10 | 1.23 |
| 太根 | 0.15 | 0.23 | 0.33 | 0.20 | 0.22 | 0.25 |
| 小計 | 0.88 | 1.38 | 1.96 | 1.22 | 1.32 | 1.47 |
| 葉 NPP（ton C $ha^{-1}y^{-1}$） | 1.66 | 1.94 | 1.92 | 1.92 | 2.03 | 1.69 |
| 樹木 NPP（ton C $ha^{-1}y^{-1}$） | 2.54 | 3.31 | 3.88 | 3.14 | 3.35 | 3.16 |

**11** (2001) P.356.
10）木村允（1976）陸上植物群落の生産量測定法　共立出版
11）T. Ohtsuka, T. Akiyama, Y. Hashimoto, M. Inatomi, T. Sakai, S. Jia, W. Mo, S. Tsuda, & H. Koizumi, Agricultural and Forest Meteorology **135** (2005) P.27.
12）T. Ohtsuka, N. Saigusa, & H. Koizumi, Global Change Biology (2009) DOI: 10.1111/ j. 1365-2486. 2008.01800.x
13）日本林学会「森林科学」編集委員会編（2003）森を測る古今書院
14）M. Kimura, M. Funakoshi, S. Sudo, T. Masuzawa, T. Nakamura, & K. Matsuda, Botanical Magazine of Tokyo **95** (1982) P.359.
15）T. D. Schowalter, W. W. Hargrove, & D. A. Crossley, Annual Review of Entomology **31** (1986) P.177.
16）R. A. Gill & R. B. Jackson, New Phytologist **147** (2000) P.13.
17）A. E. Strand, S. G. Pritchard, M. L. McCormack, M. A. Davis, & R. Oren, Science **319** (2008) P.456.
18）K. A. Vogt, D. J. Vogt, & J. Bloomfield, Plant and Soil **200** (1998) P.71.
19）J. W. Raich, & K. J. Nadelhoffer, Ecology **70** (1989) P. 1346.
20）T. Ohtsuka, W. Mo, T. Satomura, M. Inatomi, & H. Koizumi, Ecosystems **10** (2007) P.324.
21）里村多香美・中根周歩・堀越孝雄．根の研究 **10**（2001）P.3.
22）T. Satomura, Y. Hashimoto, H. Koizumi, K. Nakane, & T. Horikoshi, Ecological Research **21** (2006) P.741.
23）J. B. Gaudinski, S. E. Trumbore, E. A. Davidson, A. C. Cook, D. Markewitz, & D. D. Richter, Oecologia **129** (2001) P.420.
24）R. Matamala, M. A. Gonzalez-Meler, J. D. Jastrow, R. J. Norby, & H. Schlesinger, Science **302** (2003) P.1385.
25）P. R. Darrh, Plant and Soil **187** (1996) P.265.
26）J. M. Norton, J. L. Smith, & M. K. Firestone, Soil Biology and Biochemistry **22** (1990) P.449.
27）Y. Bekku, M. Kimura, H. Ikeda, & H. Koizumi, Ecological Research **12** (1997) P.305.
28）森田茂紀・田島亮介（監訳）「根の生態学」シュプリンガー・ジャパン，H. de Kroon & E. J. W. Visser
29）O. Shibistova, J. Lloyd, G. Zrazhevskaya et al. Tellus, **54**B (2002) P.568.
30）C. M. Gough, C. S. Vogel, H. P. Schmid, H.-B. Su, & P. S. Curtis. Agricultural and Forest Meteorology **148** (2008) P.158.
31）D. D. Baldocchi, Global Change Biology **9** (2003) P.479.
32）D. D. Baldocchi, T. A. Black, P. S. Curtis, et al., International Journal of Biometeorology **49** (2005) P.377.
33）M. L. Goulden, J. W. Munger, S.-M. Fan, B. C. Daube, & S. C. Wofsy. Science **271** (1996) P.1576.
34）A. Carrara, A. S. Kowalski, J. Neirynck, I. A. Janssens, J. Yuste, & R. Ceulemans, Agricultural and Forest Meteorology **119** (2003) P.209.
35）N. Saigusa, S. Yamamoto, S. Murayama, & H. Kondo, Agricultural and Forest Meteorology **134** (2005) P.4.
36）E. A. Davidson, B. Elizabeth, & R. D. Boone, Global Change Biology **4** (1998) P.217.
37）W. Mo, M.-S. Lee, M. Uchida, M. Inatomi, N. Saigusa, S. Mariko, & H. Koizumi. Agricultural and Forest Meteorology **134** (2005) P.81.
38）莫文紅・関川清広．日本生態学会誌 **55**（2005）P.125.
39）木部剛・鞠子茂．地球環境 **9**（2004）P.203.
40）P. S. Curtis, P. J. Hanson, P. Bolstad, C. Barford, J. C. Randolph, H. P. Schmid, & K. B. Wilson, Agricultural and Forest Meteorology **113** (2002) P.3.
41）C. C. Barford, S. C. Wofsy, M. L. Goulden, et al., Science **294** (2001) P.1688.
42）J. L. Ehman, H. P. Schimed, C. S. B. Grimmond, J. C. Randolph, P. J. Hanson, C. A. Wayson, & F. D. Cropley Global Change Biology **8** (2002) P.575.
43）西村格・松井善祐・上山智子．日本生態学会誌 **54**（2004）P.143.

# 2．個体から群落スケールの $CO_2$ ガス交換
## b．群落の物質生産
### b-4．微気象学的な測定（渦相関法による測定）

斎藤　琢[1)]

群落スケールの $CO_2$ 交換量の計測手法の一つとして微気象学的な測定が挙げられる．本章では，微気象学的手法の一つである渦相関法を用いた $CO_2$ 交換量計測を中心に紹介する．

## $CO_2$ flux measurement using eddy-covariance method

Taku M. Saitoh

To assess budgets of $CO_2$ exchange between the biosphere and atmosphere, long-term measurements have been carried out using eddy-covariance method over various ecosystems worldwide. In this chapter, we introduce eddy-covariance method. Especially, principle of measurements, calculation process of fluxes, and quality control of flux data has been described.

### 2.b-4.1　概要

群落スケールの大気と生態系間の $CO_2$ 交換量を研究対象とする場合，微気象学的な手法によって $CO_2$ フラックス[注1] を計測することが有効である．微気象学的な手法は，短い時間インターバルで連続的に物質の交換量を把握できる利点を持ち，Biometric 法（2b．3 参照）では困難な「日」から「季節」スケールでの生態系の環境応答を議論できる．微気象学的な手法には，傾度法，バルク法，乱流変動法などがある[1)]．近年は，乱流変動法の一つとして確立された計測手法である渦相関法が多用されている．乱流変動法には，他に，簡易渦集積法，バンドパスコバリアンス法などがある[1)]．

裸地，草本類群落などの水平一様な理想的な観測条件において渦相関法によって計測される $CO_2$ フラックスは，純生態系交換量（NEE: Net Ecosystem Exchange）と呼ばれ，土壌圏を含む生態系が正味として放出する $CO_2$ である．NEE は以下の式で表せられる（図 1）．

$$NEE = RE - GPP = -NEP \qquad (1)$$

ここで，RE は生態系呼吸量（Ecosystem Respiration）であり，生態系の呼吸によって放出された $CO_2$ 総量を表し，GPP は総一次生産量（Gross Primary Productivity）であり，生態系の光合成によって吸収された $CO_2$ 総量を表す．NEE が負の値のとき生態系が炭素を吸収していることを示し，純生態系生産量（NEP: Net Ecosystem Productivity）とは逆符号となる．RE は森林生態系を例に挙げれば，

$$RE = R_h + R_{root} + R_{stem} + R_{leaf} \qquad (2)$$

であり，微生物分解による呼吸量（$R_h$），根呼吸量（$R_{root}$），幹呼吸量（$R_{stem}$），葉呼吸量（$R_{leaf}$）の総和として表すことができる（図 1）．

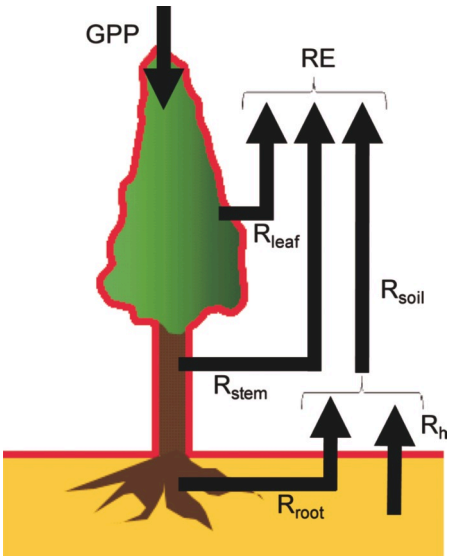



図 1：森林生態系の $CO_2$ 収支．

1）岐阜大学流域圏科学研究センター

注1　一般的には，単位面積，単位時間当たりにある面を通過する物質・エネルギーなどの量．狭義には，大気―地表面間の交換量を表す．

## 2.b-4.2　渦相関法の概念

渦相関法は，渦（乱流）によって輸送される物質量を直接的に計測する手法である．計測場所における鉛直風速と物質量の変動は，時々刻々と変化する乱流による上下方向の物質の輸送をとらえている．上向きの風は下方の物質を上方へ輸送し，下向きの風は上方の物質を下方に輸送する．このとき，上向き（下向き）に輸送される物質量が多ければ収支として物質は上向き（下向き）に輸送されたことになる．

$CO_2$ を例にすれば，裸地，草本群落，樹高が低い森林群落上などで計測される $CO_2$ フラックス（NEE）は本質的には以下のように表すことができる（各記号については表 1 参照）．

$$\mathrm{NEE} = \overline{w'c'}(\mathrm{h}) \qquad (3)$$

このとき，鉛直風の変動成分（$w'$）は乱流変動を示しており，$CO_2$ モル密度の変動（$c'$）は乱流によって上下方向へ輸送される $CO_2$ 量を示す．$w'$ と $c'$ に正（負）の相関があれば，フラックスは上向き（下向き）となり，NEE は正（負）となる．このように，フラックス値が $w'$ と $c'$ の相関と関係深いことから渦‘相関’法と呼ばれる．

**表 1**：使用記号一覧

| 記号 | 説明 |
|---|---|
| NEE | 純生態系交換量 |
| NEP | 純生態系生産量 |
| RE | 生態系呼吸量 |
| GPP | 総一次生産量 |
| $R_h$ | 微生物分解による呼吸量 |
| $R_{root}$ | 根呼吸量 |
| $R_{stem}$ | 幹呼吸量 |
| $R_{leaf}$ | 葉呼吸量 |
| $R_{soil}$ | 土壌呼吸量 |
| d | 地面修正量（m） |
| $L$ | モニンオブコフの長さ（m） |
| $u$ | x 座標方向の風速の水平成分（m s$^{-1}$） |
| $v$ | y 座標方向の風速の水平成分（m s$^{-1}$） |
| $w$ | 風速の鉛直成分（m s$^{-1}$） |
| $c$ | $CO_2$ モル密度（mol m$^{-3}$） |
| $q$ | $H_2O$ モル密度（mol m$^{-3}$） |
| $T_v$ | 音仮温度（K） |
| h | 渦相関法計測高度（m） |
| $T$ | 大気温度（K） |
| $c_{ppm}$ | $CO_2$ 濃度（ppm） |
| $R$ | 気体定数（8.3143 J mol$^{-1}$ K$^{-1}$） |
| プライム（′） | 変数の変動成分 |
| バー（¯） | 平均成分 |

## 2.b-4.3　渦相関法による計測

### 2.b-4.3.1　計測場所の選定

通常，計測器は，裸地，草本群落，背の低い森林群落では簡易ポール上に設置し，森林群落では観測タワーを建設してタワー上に設置する．ポールやタワーの設置場所（計測地点）としては，研究対象とする生態系が「水平一様」に広がる場所に観測サイトを設定することが理想である．その第 1 の理由として，渦相関法は，移流[注2]による物質輸送を無視でき，物質の鉛直輸送量は乱流による輸送量のみで説明できるという仮定に基づいている点が挙げられる．「水平一様」でない観測場所ではこの前提が崩れ，移流による物質輸送が無視できないほど大きくなることもある．第 2 の理由として，タワーで計測された $CO_2$ フラックス値は風上の群落上の各地点で乱流によって輸送された $CO_2$ 量の加重平均である点が挙げられる．図 2 はタワーで計測されたフラックス値に風上側のどの地点が最も寄与するかを示した図である．計測されたフラックス値に影響を与える地表面の領域はフットプリントと呼ばれ，風や乱流の強さに依存して常に変化する．通常，大気が安定な成層になるほど鉛直方向の混合が弱くなるので，観測地点から遠方な場所の寄与率が大きくなる．フットプリント領域に研究対象外の地表面が含まれる場合，計測されたフラックス値に研究対象外

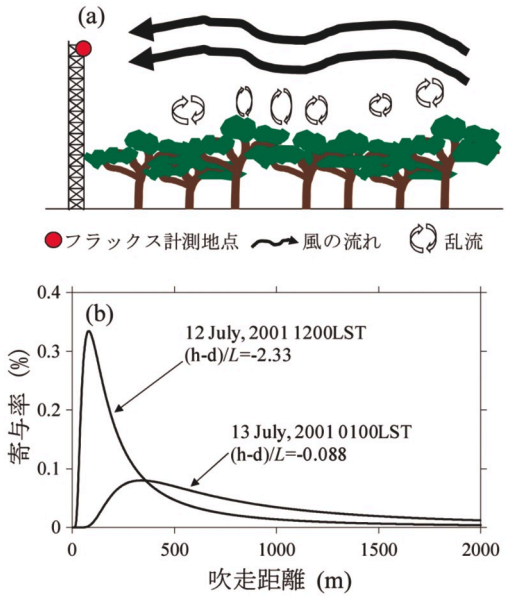



**図 2**：（a）乱流による物質の鉛直輸送の模式図と（b）タワーで計測された $CO_2$ フラックス値への風上の各地点の寄与率（マレーシア熱帯雨林における計測例）．

[注2] 乱流ではなく平均流によって物質が運ばれる現象

の地表面の情報も紛れ込むことになる．このような現象を回避するためにも，フットプリント内は，研究対象とする群落が「水平一様」に広がっていることが望ましい．必要十分な生態系の水平一様性の範囲は，生態系の構造と観測高度(樹冠の平均高度からの鉛直距離)，風速などに依存し，フットプリント解析[注3]を行うことによって事前調査が可能である[2]．しかし，実際には，研究対象とする生態系が複雑地形上や急傾斜地上にあるという理由から，必ずしも理想的な観測条件が確保できるとは限らない．このような場合には，計測されたデータに対して行う品質管理によって不適切なデータの除外を行う．

### 2.b-4.3.2　計測測器

渦相関法を用いて $CO_2$ フラックスを算出するためには，時間応答性の高い測器を用いて風速の三次元成分（$u$，$v$，$w$），温度（$T$），$CO_2$ モル密度（$c$），$H_2O$ モル密度（$q$）を計測することが必要である．これらの観測には超音波風速温度計と赤外線 $CO_2/H_2O$ ガス分析計を用いる場合が多い．超音波風速温度計は，10 Hz を超える応答速度で風速の三次元成分と温度（音仮温度 $T_v$）を計測することが可能な測器である．赤外線 $CO_2/H_2O$ ガス分析計は，$CO_2/H_2O$ モル密度（または濃度）の計測が可能であり，オープンパス式とクローズドパス式がある．オープンパス式は赤外線光路が外部に露出しており，大気中の $CO_2/H_2O$ モル密度を直接計測可能である．一方，クローズドパス式は，赤外線光路が測定器内部にあり，ポンプを用いてサンプル空気を計測セル内に導入し濃度分析を行う．現在では，超音波風速温度計，オープンパス式赤外線 $CO_2/H_2O$ ガス分析計，クローズドパス式赤外線 $CO_2/H_2O$ ガス分析計のいずれも一年を超える長期観測に耐えうる耐候性と安定性を持った測器が存在する．また，後述する補正のために，温度，湿度[注4]の計測も必要であり，超音波風速温度計と赤外線 $CO_2/H_2O$ ガス分析計と同高度で通風式の温湿度計を用いて計測を行うことが推奨される．

### 2.b-4.3.3　$CO_2$ フラックスの計算方法

5～25 Hz 程度のサンプリング周期[注5]で計測された $u$，$v$，$w$，$T_v$，$c$，$q$ の時系列から $CO_2$ フラックス値を算出するためには，平均化時間を設定する必要がある．これまでの研究から，輸送に寄与する乱流変動の統計値を求めるため，平均化時間を 30 分から 60 分と設定することが多い．この平均化時間毎の $u$，$v$，$w$，$T_v$，$c$，$q$ の時系列データを 1 ラン[注6]と呼び，$CO_2$ フラックスはこの 1 ラン毎に $c$ と $w$ の共分散によって算出される（式 (3) 参照）．実際に計算を行う際には，座標変換[3]や計測された各変数や式（3）で算出されたフラックス値に対する様々な補正を行う．代表的な補正を表 2 に示す．これらの補正や品質管理の際には，顕熱フラックス，潜熱フラックス，$H_2O$ フラックス，運動量フラックスが必要であり，$CO_2$ フラックス値を算出する際に同時に計算を行う．

**表 2**：各種補正

| 補正 | 説明 | 文献 |
|---|---|---|
| 横風補正（Crosswind correction） | 水平風の影響で音波の到達時間が長くなることにより音速が過小評価され，結果として $T_v$ も過小評価することになる．横風補正はこの $T_v$ に対する補正である． | 4,5) |
| 水蒸気補正（Humidity correction） | 超音波風速温度計によって計測される $T_v$ が水蒸気の変動成分を含んでいるため，$T$ が過大評価される．水蒸気補正はこの $T_v$ に対する補正であり，横風補正とは逆センスに働く． | 5) |
| プローブによる流れの減衰（Shadow effect） | 超音波風速温度計のプローブ部の影響で風速の測定値を過小評価する現象に対する補正であり，風速を補正する．自然風条件下における平均風速に対しては，それほど影響がないとの指摘もある[6]． | 7,8) |
| 吹き上げ角エラーの補正（Correction of attack dependent error） | 超音波風速温度計に風が吹き上げる（吹き下げる）ことよって起こる鉛直風速の過小評価，水平風速の過大評価に対する補正であり，鉛直風速，水平風速を補正する． | 9–11) |
| WPL 補正（WPL correction） | 大気の鉛直方向の密度差で生じる鉛直平均流によって輸送される $CO_2$ 量に関する補正であり $CO_2$ フラックスを補正する． | 12) |
| 加熱補正（Heating correction） | オープンパス赤外線ガス分析計のパス部分が熱せられることによっておこる気温変動の影響についての補正であり，$CO_2$ フラックスを補正する． | 13) |

[注3] Agricultural and Forest Meteorology の 127 巻 3-4 号が「Flux and Concentration Footprints」の特集号となっており，フットプリント解析について詳細に記述されている．

[注4] 温度計には，熱電対型，サーミスタ型，白金抵抗型，乾湿球型などがあり，湿度計には，静電容量型，乾湿球型などがある．温度計，湿度計がセットになった計測測器(例えば，HMP45A，Vaisala）を用いる場合も多い．通風の方式は，その設置方法によって，横型および縦型がある．また，通風方法によって，自然風のみによる自然通風式と FAN を用いた強制通風式があり，後者の方が高精度を期待できる．

[注5] サンプリング周期は，乱流輸送に寄与する乱流渦のスケールを考慮して設定する必要がある．近年は多くの観測サイトでサンプリング周期として 10 Hz が採用されている．

[注6] 10 Hz のサンプリング周期で平均化時間が 30 分の場合，1 ランの各変数のデータ数は 18000 個となる．

### 2.b-4.3.4　データの品質管理

実際に渦相関法によって得られた $CO_2$ フラックス値は，降雨時のデータ，測器のトラブルや校正時のデータ，乱流輸送が十分検出できていないと考えられるデータなど，データ利用目的に適さない様々なデータが含まれている．利用可能な $CO_2$ フラックスの時系列データセットを作成するためには，利用目的に合わせてデータの品質管理を行う必要がある．代表的な品質管理を表 3 に示す．表 3 に示す品質管理以外に，風向によるデータの除外がある．風向によるデータの除外は，ある風向に対して十分なフェッチ[注7]が得られない場合に行う．各品質管理についてはいくつかの文献で詳細に記述されているのでそれらを参照されたい[18,19]．

**表 3**：品質管理手法

| 品質管理手法 | 説明 | 文献 |
|---|---|---|
| スペクトル解析（Spectrum analysis） | 各変数の 1 ランの時系列に対してスペクトル解析を行い，パワースペクトルが理想的な形状にならないランを検出する． | 14) |
| ドロップアウト（Dropouts） | 各変数の 1 ラン内の時系列における極端な凸凹を検出する． | 15) |
| 分解能（Resolution） | 低分解能データを検出する． | 15) |
| スパイク値（Spike） | 各変数の 1 ラン内に一定以上の率でスパイクが存在するデータを検出する． | 15) |
| 絶対値（Abusolute limit） | 各変数の 1 ラン内に閾値（最大値，最小値）外のデータが一定値以上の率で出現するデータを検出する． | 15) |
| 尖度（Skewness） | 各変数の 1 ラン毎または，1 ランを数個に分割した時系列毎に得られる尖度（3 次モーメント）の閾値外データを検出する． | 15) |
| 歪度（Kurtosis） | 各変数の 1 ラン毎または 1 ランを数個に分割した時系列毎に得られる歪度（4 次モーメント）の閾値外データを検出する． | 15) |
| ハル平均値（Haar mean） | 各変数の 1 ラン内における平均値の不連続性データを検出する． | 15) |
| ハル分散値（Haar variance） | 各変数の 1 ラン内における分散の不連続性データを検出する． | 15) |
| 乱流強度（Integral turbulence characteristics） | モニン・オブコフの相似則によって想定される安定度と分散量の関係に対する適応度合を検出する． | 16) |
| 定常性（Instationarity or nonstationarity） | 各共分散の 1 ラン内における定常性の保持度合を検出する． | 16,17) |

## 2.b-4.4　渦相関法に関連した計測

### 2.b-4.4.1　様々な観測条件における NEE の推定

実際の観測では，必ずしも理想的な観測条件が揃うわけではない．このため，渦相関法による計測に加えて，非圧縮性流体における物質輸送で定義される複数の項目について計測することで NEE を算出する場合もある．非圧縮性流体において水平方向の乱流輸送[注8]を無視すると，単位地表面上の直方体における NEE は式（4）で与えられる．

$$\mathrm{NEE} = \underset{\mathrm{I}}{\overline{w'c'}(\mathrm{h})} + \underset{\mathrm{II}}{\int_0^{\mathrm{h}} \frac{\overline{\partial c(z)}}{\partial t} dz} + \underset{\mathrm{III}}{\int_0^{\mathrm{h}} \left( \bar{u}(z)\frac{\partial \bar{c}(z)}{\partial x} + \bar{v}(z)\frac{\partial \bar{c}(z)}{\partial y} \right) dz} + \underset{\mathrm{IV}}{\int_0^{\mathrm{h}} \left( \bar{w}(z)\frac{\partial \bar{c}(z)}{\partial z} \right) dz} \quad (4)$$

第 I 項は渦相関法によって取得された鉛直方向の $CO_2$ 交換量であり，第II項は貯留 $CO_2$ フラックスと呼ばれる地表面と渦相関法計測高度間の $CO_2$ 濃度の時間変化，第III項は水平方向の $CO_2$ 移流，第IV項は鉛直方向の $CO_2$ 移流である（図 3）．式（4）の各記号については表 1 を参照されたい．

第 I 項に加えてどの項を追加で計測するかは観測サイトの植生や地形によって異なる．裸地，草本類群落，背の低い森林群落の水平一様な理想的な観測条件では，通常，第II～IV項は無視し，第 I 項の算出に必要な計測を行って NEE を求める[20,21]．比較的背の高い森林群落では，樹冠内部に $CO_2$ の貯留がおこるため[22–24]，第 I 項に加えて第II項の算出に必要な $CO_2$ 濃度プロファイル計測も行うことが多い[25,26]．しかし，AC 電源供給のない観

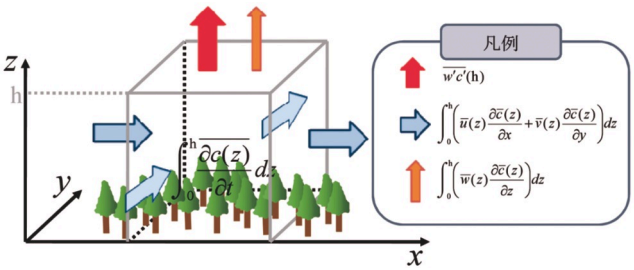



**図 3**：非圧縮性流体における乱流と移流による $CO_2$ 輸送．水平方向の乱流輸送成分は無視．

[注7] 風上側に広がる均一な地表面の観測点からの水平距離のことで吹走距離ともいう．

[注8] 一般的に水平方向の乱流変動による物質輸送は式(4)の各項に比べ小さいため無視される．

測サイトでは，$CO_2$ 濃度プロファイル連続計測の維持が困難な場合が多いため，比較的背の高い森林群落であっても第Ⅰ項の計測のみから NEE を算出する場合もある[27]．第Ⅱ項は，夜間の地表面付近の $CO_2$ 蓄積を放出する明け方と $CO_2$ 蓄積を開始する夕方の時間帯でとくに NEE の値に寄与する傾向がある[28]．第Ⅲ項，第Ⅳ項は特に複雑地形や傾斜地における観測サイト[注9]で NEE への寄与が注目されている項である[29−33]．しかし，AsiaFlux，AmeriFlux，CarboEurope-IP などのデータベースで公開されている NEE データは，第Ⅲ項，第Ⅳ項を無視して計算したものが一般的である[21−25]．その理由として，第Ⅲ項の算出については，(1)通常 2 地点以上の $CO_2$ 濃度プロファイルの高精度な計測が必要であり[28]，大がかりな観測システムとなるため研究コストがかかる，(2)連続した観測システムの維持に多大な仕事量を要する，といった理由が挙げられる．また，第Ⅳ項の算出については，渦相関法による計測と一地点の $CO_2$ 濃度プロファイル計測から算出可能ではあるが[34,35]，(1)第Ⅳ項の NEE への寄与率がどの程度かといった議論が依然不十分である，(2)鉛直平均風と $CO_2$ 濃度計測の高精度計測が要求される，といった理由が挙げられる．

#### 2.b-4.4.2 $CO_2$ 濃度プロファイル計測

式 (4) の第Ⅱ〜Ⅳ項を算出するためには，渦相関法計測高度下の $CO_2$ モル密度（$\mathrm{mol\,m^{-3}}$）の鉛直分布が必要である．とくに，貯留 $CO_2$ フラックス（式 (4) 第Ⅱ項）は背の高い森林群落で NEE への寄与が大きいことが指摘されており[21,23]，多くの森林サイトで $CO_2$ 濃度プロファイルが連続的に計測されてきた．貯留 $CO_2$ フラックス（$\mu\mathrm{mol\,m^{-2}s^{-1}}$）は，計測された $CO_2$ 濃度（ppm）と気温（K）の鉛直分布から次式で表すことができる．

$$\int_0^h \overline{\frac{\partial c(z)}{\partial t}}\,dz = \frac{\partial}{\partial t}\int_0^h \frac{c_{\mathrm{ppm}}(z)P}{RT(z)}\,dz \qquad (5)$$

ここで，$c_{\mathrm{ppm}}$ は ppm（$\mu\mathrm{mol\,mol^{-1}}$）単位系の $CO_2$ 濃度であり，$T$ が気温 (K)，$P$ は大気圧 (Pa)，$R$ は気体定数 ($8.3143\ \mathrm{J\,mol^{-1}K^{-1}}$) である．渦相関法計測高度下の $CO_2$ 濃度プロファイルの計測方法として，電磁弁制御システム，ポンプなどを用いて，各高度からチューブを通して大気サンプリングし，単一のクローズドパス赤外線ガス分析計を用いて複数の高度の $CO_2$ 濃度を自動計測する方法が一般的である[36−43]．複数の赤外線ガス分析計を用い計測することも可能ではあるが，測定時の器差の影響を受ける，測器が高価であるという理由により推奨されない．

計測高度は等間隔ではなく，濃度勾配が生じやすい地表面付近では間隔を密にし，樹冠上では間隔を粗に設定する．例えば，AsiaFlux の TKC サイト（樹高約 20 m の常緑針葉樹林）では，地上から 30.2，22.8，18.4，14.7，10.6，6.5，3.6，1.3 m の計 8 高度で計測を行っている．

#### 2.b-4.4.3 環境計測

実際に研究を行う際には，フラックス計測だけでなく，日射，気温，湿度，降水量，地温，土壌水分といった様々な微気象，土壌環境を同時に計測する必要がある．タワーにおけるフラックス観測とその周辺の環境計測例を図 4 に示す．環境計測については，多くの優良な教科書で，測定原理，計測手法，データ処理法，計測例について言及されている[44−46]．ぜひ，これらを一読されたい．

### 2.b-4.5 渦相関法の問題点

渦相関法は，現在も計測手法そのものについて議論が行われている手法である．とくに，熱収支のインバランス問題，夜間呼吸量の過小評価については現在でも日々多くの論文で議論されている．

熱収支のインバランス問題とは，有効エネルギー（純放射量と地中熱流量の差）と乱流フラックス（渦相関法によって計測された顕熱と潜熱の和）は理論的には等しくなるが，実際の観測結果では両者が等しくならないという現象を指す．複数の観測サイトを研究対象とした論文[47]によれば，有効エネルギーに対する乱流フラックスの比は平均で 0.8 程度となり，この値がデータの品質の一つの目安となっている．

夜間呼吸量（夜間 NEE）の過小評価は，乱流が十分発達していない安定成層条件下で式 (4) の I 項が小さくなることで起こる．夜間 NEE の過小評価はとくに年積算の RE，GPP，NEP を推定する際に誤差を生む．年積算 RE，GPP，NEP を推定するためには，計測トラブルや品質管理によって欠損となったデータを補完する必要がある．この補完方法には，(1)NEE と環境要因（例えば，光合成有効放射量，気温，地温，土壌水分量）の関係から非線形回帰曲線を用いてデータギャップを埋める手法，(2)計測データから各期間毎（例えば，数日，10 日程度，一か月）の平均日変化パターンのデータセットを用意しデータギャップを埋める手法，(3)環境要因をある一定の幅で階級分けし，その階級ごとに NEE の平均値を算出した表を作成し，欠側日時の環境要因が当てはまる

[注9] Ecological Applications の 18 巻 6 号が「Eddy Flux Measurements in Difficult Conditions」の特集号となっており，理想的ではない観測条件におけるフラックス計測について詳細に記述されている．

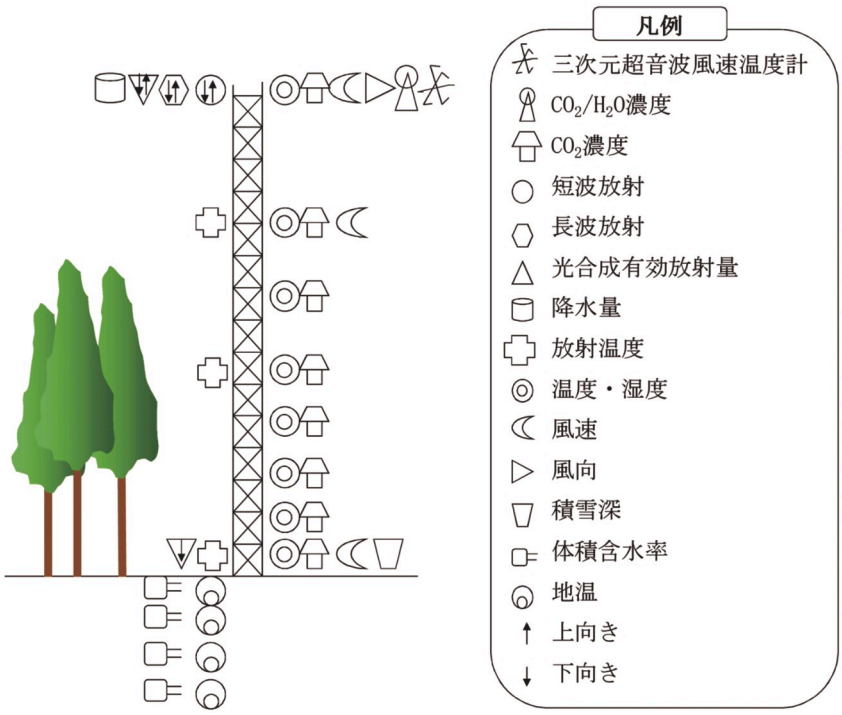



**図 4**：フラックス観測タワーにおける計測例.

階級の NEE 値によってデータギャップを埋める手法，などがある[25]．何れの方法でも，過小評価された夜間 NEE を含むデータセットを用いて年積算 NEP を推定した場合，年積算 RE が過小評価され，年積算 NEP は過大評価される結果となる．

この過小評価を回避するために摩擦速度（$u^*$）が小さい（乱流の発達が十分ではない）ときの夜間 NEE データを除去する方法を用いることが一般的である[7,8]．$u^*$ の閾値を増加させると夜間 NEE の値も増加するが，この夜間 NEE の増加が飽和したと判断される値を $u^*$ の閾値とする．$u^*$ の閾値は観測サイト毎に異なるが，多くのサイトでは 0.5 m $s^{-1}$ 以下の値となる[25,48]．最近では，$u^*$ の閾値を用いた手法の他に，夜間 NEE の各日の最大値のみを用いて温度―夜間 NEE 曲線を作成し RE を推定する手法[28]や，チャンバー法によって計測された土壌呼吸量の値を基準として RE を推定する手法[27]などが提案されている．

## 2.b-4.6　おわりに

微気象学的な手法は，短い時間分解能で連続的に物質の交換量を把握できる利点がある一方，その計測や得られたフラックス値の計算手法，データの補完方法に様々問題を持っており発展途上の手法であるといえる．このため，微気象学的な手法によって得られた NEP，GPP，RE の年積算値など定量値を議論する際には，積み上げ法による推定値やチャンバー法によって計測された $R_{soil}$ とクロスチェックすることが重要となる．一方で，微気象学的な手法は，相対値の議論に十分な観測精度を持っており，日変化や季節変化レベルの生態系の環境応答に関する研究に大いに活用されるべきである．ただし，本稿で示した計測手法，補正方法，データの補完方法については，推奨される手法が更新されることもあるので，最新の論文で確認することが望ましい．

## 参考文献


1）塚本修，文字信貴編，「気象研究ノート　第 199 号　地表面フラックス測定法」，日本気象学会，2001，p.242.
2）P. H. Schuepp, M. Y. Leclerc, J. I. MacPherson, & R. L. Desjardins, *Boundary-Layer Meteorol.* **50** (1990) p.355.
3）X. Lee, W. Massman, & B. Law, Handbook of Micrometeorology: A guide for surface Flux Measurement and Analysis, Kluwer Academic Pub, 2004, p.250.
4）J. C. Kaimal, & J. E. Gaynor, *Boundary-Layer Meteorol.* **56** (1991) p.401.
5）P. Schotanus, F. T. M. Nieuwstadt, & H. A. R. de Bruin, *Boundary-Layer Meteorol*., **26** (1983) p.81.
6）T. Hanafusa, T. Fujitani, Y. Kobori, & Y. Mitsuta, *Papers Metepr. Geophys.* **33** (1982) p.1.
7）T. Shimizu, M. Suzuki, & A. Shimizu, *Boundary-Layer Meteorol.* **93** (1999) p.227.

8）J. C. Kaimal, J. E. Gaynor, H. A. Zimmerman, & G. A. Zimmerman, *Boundary-Layer Meteorol.* **53** (1990) p.103.
9）J. H. C. Gash, & A. J. Dolman, *Agric. For. Meteorol.* **119** (2003) p.195.
10）T. Nakai, M. K. van der Moren, J. H. C. Gash, & Y. Kodama, *Agric. For. Meteorol.* **136** (2006) p.19.
11）M. K. van der Moren, J. H. C. Gash, & J. A. Elbers, *Agric. For. Meteorol.* **122** (2004) p.95.
12）E. K. Webb, G. I. Pearman, R. Leuning, *Quart. J. R. Meteorol. Soc.* **106** (1980) p.85.
13）G. G. Burba, D. J. Anderson, L. Xu, & D. K. McDermitt, *27th Conference on Agricultural and Forest Meteorology*, (2006) p4.4.
14）J. C. Kaimal, & J. J. Finnigan, Atmospheric Boundary Layer Flows: Their Structure and Measurement, Oxford University Press, 1994, p.289.
15）D. Vickers, & L. Mahrt, *J. Atmos. Oceanic Technol.* **14** (1997) p.512.
16）T. Foken, & B. Wichura, *Agric. For. Meteorol.* **78** (1997), p.83.
17）L. Mahrt, *J. Atmos. Oceanic Technol.* **15** (1998) 416.
18）間野正美，宮田明，安田幸生，永井秀幸，山田智康，小野圭介，齊藤誠，小林義和，農業気象 **63**（2007）p.125.
19）AsiaFlux 運営委員会編，「陸域生態系における二酸化炭素等のフラックス観測の実際」，独立行政法人国立環境研究所地球研究センター，2003，p.116.
20）T. Kato, Y. Tang, S. Gu, X. Cui, M. Hirota, M. Du, Y. Li, X. Zhao, T. Oikawa, *Agric. For. Meteorol.* **124** (2004) p.121.
21）L. Xu, & D. D. Baldocchi, *Agric. For. Meteorol.* **122** (2004) p.79.
22）R. Hirata, T. Hiratno, N. Saigusa, Y. Fujinuma, K. Inukai, Y. Kitamori, Y. Takahashi, S. Yamamoto, *Agric. For. Meteorol.* **147** (2007) p.110.
23）Y. Malhi, A. D. Nobre, J. Grace, & B. Kruijt, *J. Geophys. Res.* D**24** (1998) p.31593.
24）N. Saigusa, S. Yamamoto, S. Murayama, H. Kondo, & N. Nishimura, *Agric. For. Meteorol.* **112** (2002) p.203.
25）E. Falge, D. Baldocchi, R. Olson, P. Anthoni, M. Aubinet, C. Bernhofer, G. Burba, R. Ceulemans, R. Clement, H. Dolman, A. Granier, P. Gross, T. Grünwald, D. Hollinger, N.-O. Jensen, G. Katul, P. Keronen, A. Kowalski, C. T. Lai, B. E. Law, T. Meyers, J. Moncrieff, E. Moors, J. W. Munger, K. Pilegaard, Ü. Rannik, C. Rebmann, A. Suyker, J. Tenhunen, K. Tu, S. Verma, T. Vesala,. Wilson, & S. Wofsy, *Agric. For. Meteorol.* **107** (2001) p.43.
26）R. Hirata, N. Saigusa, S. Yamamoto, Y. Ohtani, R. Ide, J. Asanuma, M. Gamo, T. Hirano, H. Kondo, Y. Kosugi, S. -G. Li, T. Nakai, K. Takagi, M. Tani, & H. Wang, *Agric. For. Meteorol.* **148** (2008) p.761.
27）Y. Kosugi, S. Takanashi, S. Ohkubo, N. Matsuo, M. Tani, T. Mitani, D. Tsutsumi, & A. R. Nik, *Agric. For. Meteorol.* **148** (2008) p.439.
28）E. van Gorsel, R. Leuning, H. A. Cleugh, H. Keith, & T. Suni, *Tellus* 59B (2007) 59B, p.397.
29）M. Aubinet, P. Berbigier, C. H. Bernhofer, A. Cescatti, C. Feigenwinter, A. Granier, T. H. Rrünwald, K. Havrankova, B. Heinesch, B. Longdoz, B. Marcolla, L. Montagnani, & P. Sedlak, *Boundary-Layer Meteorol.* **116** (2005) p.63.
30）C. Feigenwinter, C. Bernhofer, & R. Vogt, *Boundary-Layer Meteorol.* **113** (2004) p.201.
31）C. Feigenwinter, C. Bernhofer, U. Eichelmann, B. Heinesch, M. Hertel, D. Janous, O. Kolle, F. Lagergren, A. Lindroth, S. Minerbi, U. Moderow, M. Mölder, L. Montagnani, R. Queck, C. Rebmann, P. Vestin, M. Yernaux, M. Zeri, W. Ziegler, & M. Aubinet, *Agric. For. Meteorol.* **148** (2008) p.12.
32）B. Marcolla, A. Cescatti, L. Montagnani, G. Manca, G. Kerschbaumer, & S. Minerbi, *Agric. For. Meteorol.* **130** (2005) p.193.
33）K. T. Paw U, M. Falk, T. H. Suchanek, S. L. Ustin, J. Chen, Y.-S. Park, W. E. Winner, S. C. Thomas, T. C. Hsiao, R. H. Shaw, T. S. King, R. D. Pyles, M. Schroeder, A. A. Matista, *Ecosystems* **7** (2004) p.513.
34）X. Lee, *Agric. For. Meteorol.* **91** (1998) p.39.
35）D. D. Baldocchi, J. Finnigan, K. Wilson, K. T. Paw U, & E. Falge, *Boundary-Layer Meteorol.* **96** (2000) p.257.
36）斎藤琢，熊谷朝臣，佐藤嘉展，鈴木雅一，水文・水資源学会誌 **17**（2004）p.648.
37）B. Saugier, & E. A. Ripley, *J. Appl. Ecol.* **11** (1974) p. 103.
38）P. V. Biscoe, J. A. Clark, K. Gregson, M. McGowan, J. L. Monteith, & R. K. Scott, *J. Appl. Ecol.* **12** (1975) p.227.
39）J. M. Skell, T. S. Fredericksen, J. E. Savage, & K. R. Snyder, *Environ. Pollut.* **94** (1996) p.235.
40）F. A. Bazzaz, & W. E. Williams, *Ecology* **72** (1991) p.12.
41）J. R. Brooks, L. B. Flanagan, G. T. Varney & J. R. Ehleringer, *Tree Physiol.*, **17** (1997) p.1.
42）N. Buchmann, & J. R. Ehleringer, *Agric. For. Meteorol.* 89 (1998) p.45.
43）L.-K. Xu, A. A. Matista, & T. C. Hsiao, *Agric. For. Meteorol.* 94 (1999), p.1.
44）森林立地調査法編集委員会編，「森林立地調査法　森の環境を測る」，博友社，2002，p.284.
45）日本農業気象学編，「新訂　農業気象の測器と測定法」，農業技術協会，1997，p.345.
46）牛島素行編，「身近な気象・気候調査の基礎」，古今書院，2000，p.195.
47）K. Wilson, A. Goldstein, E. Falge, M. Aubinet, D. Baldocchi, P. Berbigier, C. Bernhofer, R. Ceulemans, H. Dolman, C. Field, A. Grelle, A. Ibrom, B. E. Law, Andy Kowalski, T. Meyers, J. Moncrieff, R. Monson, W. Oe-

chel, J. Tenhunen, R. Valentini, & S. Verma, *Agric. For. Meteorol.* **113** (2002) p.223.
48) N. Saigusa, S. Yamamoto, R. Hirata, Y. Ohtani, R. Ide, J. Asanuma, M. Gamo, T. Hirano, H. Kondo, Y. Kosugi, S.-G. Lie, Y. Nakai, K. Takagi, M. Tani & H. Wang, *Agric. For. Meteorol.* **148** (2008) p.700.

# 3．ガスチャンバー法（同化箱法）および重量法による個葉の蒸散特性の評価

松尾奈緒子[1)]，三木　直子[2)]，廣部　宗[2)]

光合成活動に影響を与える要因の一つである葉の蒸散特性の評価法として，ガスチャンバー（同化箱）法による解析と重量法による解析がある．これらの解析は蒸散に関する種特性を評価する上で有効である．

## Evaluation of transpiration properties by gas chamber and gravimetric methods

Naoko MATSUO (section 3.2), Naoko MIKI, Muneto HIROBE (section 3.3)

Gas chamber methods and gravimetric methods of dehydration from leaves can provide evaluation of transpiration properties, which are the factors affecting photosynthesis. These analyses would be suitable to evaluate inter-specific differences in transpiration properties in plant species.

## 3.1　はじめに

光合成活動に必要な $CO_2$ の取り込みと蒸散活動における $H_2O$ の放出は，主に同一経路である葉の気孔を介して行われる．この気孔の開閉は主に，光，$CO_2$ 濃度，葉の細胞の水分状態（水ポテンシャル）に制御されることから，葉における蒸散（失水）は気孔の開閉を通じて光合成速度に少なからず影響を与える．ここでは蒸散特性についての測定方法のうち，ガスチャンバー（同化箱）法（gas chamber methods）と重量法（gravimetric methods）について概説する．ガスチャンバー法は，近年，測定機器の発展に伴い最も広く用いられており，また，重量法は複雑で高額な測器が特に不要で歴史的に古くから用いられている方法の一つである．

## 3.2　ガスチャンバー法による蒸散速度と気孔コンダクタンスの測定

松尾　奈緒子

### 3.2.1　蒸散速度と気孔コンダクタンス

葉が光合成のため気孔を開くと，気孔内外の水蒸気濃度勾配にしたがって細胞間隙から大気へと水蒸気が拡散していく．これが蒸散であり，蒸散速度 $E$（mol $m^{-2}s^{-1}$）は Fick の法則により次式のように表される．

$$E = g_{tw}(W_i - W_a) \quad (1)$$

ここで，$g_{tw}$ は水蒸気拡散に対する全コンダクタンス（mol $m^{-2}s^{-1}$），$W_i$ は細胞間隙の水蒸気モル分率（mol $mol^{-1}$），$W_a$ は大気中の水蒸気モル分率（mol $mol^{-1}$）である．水蒸気拡散に対する全コンダクタンス（$g_{tw}$）は気孔コンダクタンス（$g_{sw}$）および葉面境界層コンダクタンス（$g_{bw}$）とからなる．片面気孔の葉の場合，この水蒸気拡散に関する全コンダクタンス（$g_{tw}$）は次式で表せる．

$$\frac{1}{g_{tw}} = \frac{1}{g_{sw}} + \frac{1}{g_{bw}} \quad (2)$$

ここで，$g_{sw}$ と $g_{bw}$ はそれぞれ水蒸気拡散に対する気孔コンダクタンス（mol $m^{-2}s^{-1}$）と葉面境界層コンダクタンス（mol $m^{-2}s^{-1}$）である．葉面境界層とは葉の表面において摩擦により風速が減衰している空気層のことを言う．葉面境界層コンダクタンスは葉面境界層における水蒸気の拡散のしやすさを表し，その大きさは葉の形状や粗度，葉のつく角度と風速によって決まる．なお，光合成の際の二酸化炭素拡散に対するコンダクタンスは，上述の水蒸気拡散に対するコンダクタンスと次のような関係にあることを注意しなくてはならない．静流条件での水蒸気分子の拡散係数は二酸化炭素分子の 1.6 倍となるので，水蒸気に対する気孔コンダクタンス（$g_{sw}$）と二酸化炭素に対する気孔コンダクタンス（$g_{sc}$）との間には次式の関係が成り立つ．

$$g_{sc} = \frac{g_{sw}}{1.6} \quad (3)$$

ここで，$g_{sc}$ は二酸化炭素拡散に対する気孔コンダクタンス（mol $m^{-2}s^{-1}$）である．一方，葉面境界層は強制対流条件であるため，水蒸気分子の拡散係数は二酸化炭素分子の 1.37 倍となる．したがって，水蒸気に対する葉面境

1）三重大学大学院生物資源学研究科
2）岡山大学大学院環境学研究科

界層コンダクタンス（$g_{bw}$）と二酸化炭素に対する葉面境界層コンダクタンス（$g_{bc}$）との間には次式の関係が成り立つ．

$$g_{bc}=\frac{g_{bw}}{1.37} \tag{4}$$

ここで，$g_{bc}$ は二酸化炭素拡散に対する葉面境界層コンダクタンス（mol $m^{-2}s^{-1}$）である．

細胞間隙の水蒸気濃度（$W_i$）を算出するには，細胞間隙が葉温において水蒸気飽和していると仮定する．ある温度における飽和水蒸気圧（$e_s(T)$）の算出法としては，Smithsonian Meteorological Table（1984）による対応表や数種類の経験式が提案されている[1]．そのうちのひとつ Lowe（1971）の飽和水蒸気圧式によると，ある温度における飽和水蒸気圧（$e_s(T)$）は次式で与えられる[2]．

$$\begin{aligned} e_s(T)=&6.1078+4.4365\times10^{-1}T+1.4289\times10^{-2}T^2\\ &+2.6505\times10^{-4}T^3+3.0312\times10^{-6}T^4\\ &+2.0341\times10^{-8}T^5+6.1368\times10^{-11}T^6 \end{aligned} \tag{5}$$

ここで，$e_s(T)$は温度が摂氏 $T$℃のときの飽和水蒸気圧（hPa）である．したがって，細胞間隙の水蒸気圧は葉温が $T_l$℃のときの飽和水蒸気圧 $e_s(T_l)$となる．この $e_s(T_l)$ を大気圧（$P_a$）で除した値が細胞間隙の水蒸気モル分率（$W_i$）となる．

$$W_i=\frac{e_s(T_l)}{P_a} \tag{6}$$

また，大気水蒸気圧（$e_a$）は次式により得られる．

$$e_a=\frac{Rh}{100}e_s(T_a) \tag{7}$$

ここで，$e_a$は大気水蒸気圧（hPa），$Rh$ は相対湿度（%），$e_s(T_a)$は気温 $T_a$℃における飽和水蒸気圧（hPa）である．大気水蒸気圧（$e_a$）を大気圧（$P_a$）で除した値が大気中の水蒸気モル分率（$W_a$）となる．

$$W_a=\frac{e_a}{P_a} \tag{8}$$

細胞間隙水蒸気圧（$e_s(T_l)$）と大気水蒸気圧（$e_a$）の差を葉面における飽差（Vapor pressure deficit, VPD）という．

$$VPD=es(T_l)-e_a \tag{9}$$

ここで，$VPD$ は飽差（hPa）である．この飽差（$VPD$）を大気圧（$P_a$）で除した値が気孔内外の水蒸気モル分率差（$W_i-W_a$）であり，(1) 式を見てもわかるように蒸散速度を決定する要因のひとつである．飽差が大きいとき，つまり大気が乾燥しているときは蒸散速度が大きくなる．しかし，飽差は気孔コンダクタンス（$g_{sw}$）の大きさにも影響を与える．飽差が増加するにつれて気孔コンダクタンス（$g_{sw}$）は低下し，飽差に対する応答は樹種や個体によって異なることが知られている[3]．

### 3.2.2　ガスチャンバー法

蒸散速度の主な測定方法にはガスチャンバー（同化箱）法と重量法がある．ガスチャンバー法の測定原理やシステムについては「2.2 個葉の光合成および呼吸測定システム」に詳細な解説があるので参照されたい．ここでは，ガスチャンバー（同化箱）内に空気が一定の流量で流入・流出する開放系システムである携帯型光合成蒸散測定装置（Li-Cor 社の LI-6400 など）を用いた測定について簡単に説明する．このシステムにおいて，空気の流れは葉が入ったチャンバーを通過する経路（サンプル）とチャンバーを通過しない経路（リファレンス）とに分岐する．チャンバー内の水蒸気のマスバランスは次式のように表せる．

$$LE=F_{out}W_{out}-F_{in}W_{in} \tag{10}$$

ここで，$L$ はチャンバー内の葉面積（$m^2$），$E$ は蒸散速度（mol $m^{-2}s^{-1}$），$F_{in}$ と $F_{out}$ はそれぞれチャンバーに流入する空気とチャンバーから流出する空気の流量，$W_{in}$ と $W_{out}$ はそれぞれチャンバーに流入する空気とチャンバーから流出する空気の水蒸気濃度（mol $mol^{-1}$）である．流入した空気に蒸散による水蒸気が加わってチャンバーから出て行くので，チャンバーから流出する空気の流量（$F_{out}$）は，

$$F_{out}=F_{in}+LE \tag{11}$$

となる．式 (11) を式 (10) に代入すると，蒸散速度（$E$）は次式で得られる．

$$E=\frac{F_{in}(W_{out}-W_{in})}{L(1-W_{out})} \tag{12}$$

携帯式光合成蒸散測定装置（Li-Cor 社の LI-6400）では，赤外線ガスアナライザー（Infra Red Gas Analyzer：IRGA）で測定したサンプルとリファレンスの水蒸気モル分率を $W_{out}$ と $W_{in}$ としている．

蒸散速度（$E$）と水蒸気拡散に対する全コンダクタンス（$g_{tw}$）の関係を示した（1）式は空気中に水蒸気だけが存在する場合の式である．実際の空気中には二酸化炭素分子と水蒸気分子とが存在することを考慮すると，蒸散速度（$E$）は次式のように表される[5]．

$$E=g_{tw}(W_{out}-W_{in})+\frac{W_{out}+W_{in}}{2}E \tag{13}$$

したがって，水蒸気拡散に対する全コンダクタンス（$g_{tw}$）は次式で得られる．

$$g_{tw}=\frac{E\left(1-\frac{W_{out}+W_{in}}{2}\right)}{W_{out}-W_{in}} \quad (14)$$

水蒸気拡散に対する気孔コンダクタンス（$g_{sw}$）は（2）式より，

$$g_{sw}=\frac{1}{\frac{1}{g_{tw}}-\frac{1}{g_{bw}}} \quad (15)$$

となる．（15）式において，気孔コンダクタンス（$g_{sw}$）を求めるには葉面境界層コンダクタンス（$g_{bw}$）の値が必要となる．携帯式光合成蒸散測定装置ではチャンバー内の風速を一定に保っているため，葉面境界層コンダクタンスは一定であると仮定して装置ごとに設定された値をそのまま用いることが多い．このとき，両面気孔の葉では両面に葉面境界層ができるので，葉面境界層コンダクタンスは片面気孔の葉の2倍となることに注意する．ただし，3.2.1で述べたように葉面境界層コンダクタンスは葉の形状・粗度・角度によっても異なることにも注意しなくてはならない．そこで，紙などを使って実際の葉に似せたモデルを作り，それを水に濡らして一定時間にどれだけの水が蒸発するかによって葉面境界層コンダクタンスを求めることがある．

$$g_{bw}=\frac{E_p}{W_p-W_a} \quad (16)$$

ここで，$E_p$ は紙からの蒸発速度（mol $m^{-2}s^{-1}$），$W_p$ と $W_a$ はそれぞれ紙の表面と大気の水蒸気モル分率（mol $mol^{-1}$）である．

開放系のガスチャンバー法には上述のシステムの他にも，乾燥空気を流してチャンバー内の湿度を一定に保つタイプがある（Li-Cor社のLI-1600など）．これは，チャンバー内の湿度を湿度計でモニタリングし，蒸散により水蒸気濃度が上昇すると乾燥空気を送り込み，チャンバー内の湿度を一定に保つよう調節するという仕組みである．このときの湿度と乾燥空気の流量から蒸散量を算出する．

また，閉鎖系のガスチャンバー法（Decagon DeviceのSC-1など）もある．閉鎖型のチャンバーに葉を挟み，チャンバー内の水蒸気濃度の上昇速度から蒸散速度を算出している．このシステムではチャンバー内の湿度が上昇するにつれて蒸散速度が低下してしまったり，チャンバー内の湿度が大気よりも高い状態で葉を挟むと蒸散速度がうまく測定できないなど問題点があり，注意が必要である．

## 引用文献


1）R. List, Smithsonian Meteorological Tables, Smithsonian Inst. Press., Washington DC, USA, 1984.
2）P. R. Lowe, J. Appl. Meteor. **16** (1976) P.100–103.
3）E.-D. Schulze & A. E. Hall, Physiological Plant Ecology II. Encyclopedia of Plant Physiology Vol 12B., eds. O. L. Lange, P. S. Nobel, C. B. Osmond, H. Ziegler, Springer, Berlin Heidelberg New York, 1982, P.181–230.
4）P. D. Jarman, J. Exp. Bot. **25** (1974) P.927–936.
5）S. von Caemmerer & G.. D. Farquhar, Planta **153** (1981) P.376–387.


## 3.3　重量法による蒸散特性の評価


三木　直子・廣部　　宗


### 3.3.1　重量法

(1)　rapid-weighting method

重量法にもいくつかの手法があるが，大きくは2種類に分けることができる．一つは植物体の採取後に直ちに重量を短時間計測し，採取直後の重量の減少速度から，その植物体のおかれた自然条件下における採取時の蒸散速度を算出するものである．重量法において最もシンプルな手法であり，rapid-weighting method[1,2]と呼ばれる．この測定法は，採取後の数分間の蒸散速度は採取前の蒸散速度と有意な差は無いという仮定の基に成り立っている．しかし，供試植物によって傾向が異なる可能性があるため採取前と採取後の値についてガスチャンバー法等を用いて確認をした方がよい．また，葉に近い部分で植物体を採取した場合，採取直後の蒸散速度が一時的に増加する「IVANOV effect」[3]と呼ばれる現象も時折確認されていることから，採取にあたってはシュート単位などの方が好ましい．蒸散速度は採取個体の重量の減少速度から求められ，目的に応じて単位乾重，単位生重，あるいは単位葉面積あたりでの解析も可能である．

#### ［測定手順と解析］

植物体は採取後，吸水させずに直ちに切り口にワセリンを塗り，空の広口バイアル瓶に入れて重量を測定する．植物体採取後から測定開始までの間隔および測定間隔はできるだけ短くし（30秒から1分程度），10分から20分ほど測定する．対象となる植物体の自然条件下における採取時の蒸散速度を求めることが目的であることから，測定は植物体がおかれていた自然条件下において行う必要がある．供試する植物体のサイズによって異なるが，シュート単位ほどのサイズの測定では最小目盛り0.1

mg で風防付きの電子天秤が好ましい．

得られた生重量の変化データから，積算失水量の採取直後の変化曲線を得ることができる．積算失水量は時間経過に伴い測定後数分は直線的に増加するが，その後は曲線的な増加を示す．そのため，直線的な増加が認められる部分における直線回帰の傾きから蒸散速度を求めることができる．一般的には直線的な増加は 5 分から 10 分程度認められるが，供試植物によって異なる可能性があることから 10 分から 20 分程度測定を継続してその範囲を見極めた方がよい．

⑵　失水曲線法

重量法におけるもう一つの手法として，乾燥に伴う失水曲線（water loss curve，あるいは leaf drying curve）を用いた解析がある．失水曲線は採取した植物体を一度十分に飽和させた後，制御した一定の環境条件下において，失水による重量変化を比較的長時間（5 時間から 10 時間程度）連続的に測定することで得ることができる．これは前者とは異なり，各供試材料における specific な潜在的蒸散能の評価を行うものである．

Fukuda[4] および Hygen[5,6,7] は失水曲線を基に気孔蒸散速度とクチクラ蒸散速度を分けることを試みた．採取した植物体を人工光の下で強制的に蒸散させることにより，失水による重量変化曲線を作成することができる．重量は一定の環境条件下において時間経過に伴い指数関数的な減少を示す．そのため，時間経過に対する植物体の含水率の対数変化をプロットすると，測定開始時の飽和条件下では含水率は直線的に低下し，やがて曲線的な低下に変わり，その後，再度直線的な低下を示す．彼らはこの傾きの変化に失水に伴う気孔閉鎖が関わっていると考え，最初の直線段階を気孔開度が最大で開度に変化が見られない stomatal phase，次の曲線的な変化の段階を気孔の閉鎖が起こっている closing phase，そして最後の直線的な段階を気孔が閉じ終わった cuticular phase であるとした．

[測定手順と解析]

植物体は採取後，直ちに水中において水切りし，切り口を水で満たした容器に入れ一晩十分に吸水させ飽和させておく．切り口にワセリンを塗り，空の広口バイアル瓶に入れ強光条件下に置き，一定間隔（例えば 1 分から 2 分間隔）で重量変化が安定するまで（5 時間から 10 時間程度）重量を測定する．供試する植物体のサイズによって異なるが，葉やシュートを用いる場合には最小目盛り 0.1 mg の電子天秤を使うとよい．室内の環境条件は気孔を十分に開く上で適した条件に制御する必要がある（例えば，気温＝25°C，湿度＝50%，PFD＝500 $\mu$mol m$^{-2}$ s$^{-1}$）．

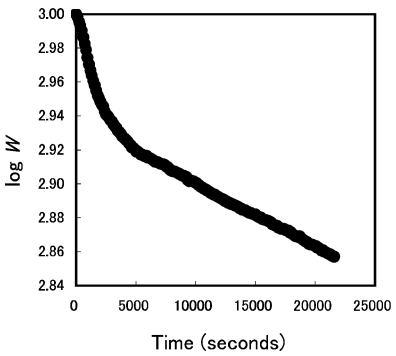



**図 1**：含水率の対数値の経時変化（*Betula platyphylla* var. *japonica* で作図）

得られた生重量の変化データ（$w$）を，試料の測定開始時（initial）の生重を 1000 mg としたときの値（$W$；含水率（千分率））に変換し，$\log W = \mathrm{f}(t)$の片対数グラフを作成する（図 1）．この片対数グラフから視覚的に stomatal phase，closing phase，cuticular phase を区別し，stomatal phase，cuticular phase それぞれにおける蒸散速度を算出し，気孔蒸散速度およびクチクラ蒸散速度を求める．

気孔の開閉は植物の乾燥に対する応答特性として非常に重要であることから，この手法はこれまで蒸散速度としか扱っていなかったものを，気孔応答を考慮し気孔蒸散とクチクラ蒸散に分けて評価する試みとして価値が高い．しかしながら，この手法は各 phase の境界を視覚的に区別することから主観的であると指摘せざるを得ず，また算出方法が複雑であることも無視できない．

### 3.3.2　失水曲線を用いた新たな評価法の可能性

ここで，水の損失に対して，完全に気孔を閉鎖することのできる植物を想定した場合，以下のような評価が考えられる．

乾燥に伴う植物体の重量減少は葉における蒸散量を表している．したがって，植物体の蒸散量（$TT$）は気孔蒸散量（$TS$）とクチクラ蒸散量（$TC$）の和として表される．

$$TT = TS + TC \qquad (1)$$

気孔コンダクタンスは乾燥に対して指数関数的に低下することが報告されている[8]．したがって，気孔は時間経過とともに同じ割合で閉じると仮定すると，ある時刻 $t$ において開いている気孔数（$X_t$）は以下のように表される．

$$X_t = X_0 \times e^{-kt} \quad (2)$$

ここで，$X_0$ は全気孔数，$k$ は気孔閉鎖に関する定数である．

ある時刻 $t$ における気孔蒸散速度（$Ts_t$）は以下のように表される．

$$Ts_t = S \times X_t, \quad (3)$$

ここで $S$ は気孔一つあたりの蒸散速度である．

式（2）と式（3）より，

$$Ts_t = S \times X_0 \times e^{-kt} = Ts_{\max} \times e^{-kt}, \quad (4)$$

ここで，$Ts_{\max}$ は最大気孔蒸散速度である．

また，$TS$ は $Ts_t$(4) の積分値であるので，

$$\begin{aligned} TS &= \int_0^{\infty} Ts_t dt = \int_0^{\infty} (Ts_{\max} \times e^{-kt}) dt \\ &= Ts_{\max} \times (-\frac{1}{k} \times e^{-kt} + C), \end{aligned} \quad (5)$$

$C$ は積分定数．

時刻 $t=0$ のとき，$TS$ は 0 であることから，

$$Ts_{\max} \times (-\frac{1}{k} \times e^0 + C) = 0,\ C = \frac{1}{k} \quad (6)$$

式（5）と式（6）より以下の式が得られる．

$$TS = Ts_{\max} \times (-\frac{1}{k} \times e^{-kt} + \frac{1}{k}) = \frac{Ts_{\max}}{k}(1 - e^{-kt}) \quad (7)$$

クチクラ蒸散速度（$Tc$）は一定で時間変化がないと仮定すれば，クチクラ蒸散量（$TC$）は次のように表すことができる．

$$TC = Tc \times t \quad (8)$$

式（1），式（7），および式（8）より，採取した植物体の蒸散量（$TT$）の時間変化は以下のように表すことができる．

$$TT = TS + TC = \frac{Ts_{\max}}{k}(1 - e^{-kt}) + Tc \times t \quad (9)$$

測定手順は Fukuda[4] および Hygen[5,6,7] とほぼ同様であるが，彼らは解析において，採取した植物体の生重の変化曲線を用いたのに対し，我々が提案するこの評価法では積算失水量の変化曲線（図 2）を用いる．図 2 では単位葉面積あたりの積算失水量の変化を示しているが，目的により単位乾重，あるいは単位生重あたりでの解析も可能である．各積算失水量の変化曲線に対し式 (9) を当てはめると $Ts_{\max}$，$Tc$，$k$ の 3 つのパラメータを客観的に得ることができる．実際に，数種の植物（*Artemisia sphaerocephala*；落葉半潅木［中国の温帯ステップにおいて一般的な種］，*Betula platyphylla* var. *japonica*；落葉広葉樹［冷温帯の代表的樹種］，*Castanopsis cuspidata*；常緑広葉樹［暖温帯の代表的樹種］）にこの式 (9) を適用してみると，曲線全体において非常によく当てはまっているように思われる（図 2）．ただし，この評価は，完全に気孔を閉鎖することのできる植物を想定している点に気をつけなければならない．実際には $Tc$ の中に残余の気孔蒸散速度，つまり気孔を最大限閉じても閉じきれなかったために生じる気孔蒸散速度がわずかながら含まれている場合があるため，気孔が閉じきっているかどうかを実体顕微鏡，あるいはスンプ法等により確認した方がより正確な評価が可能である．スンプ法とは

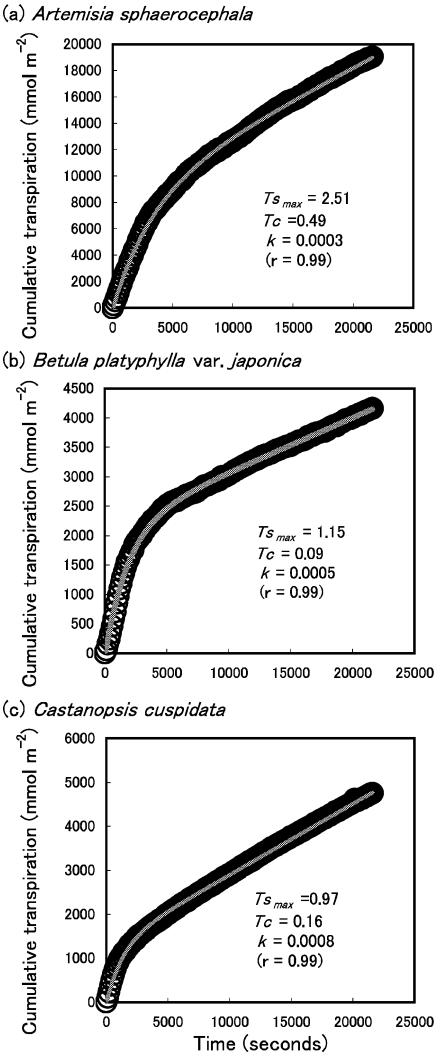



**図 2**：*Artemisia sphaerocephala*（a），*Betula platyphylla* var. *japonica*（b）および *Castanopsis cuspidata*（c）の単位葉面積あたりの積算失水量の経時変化
（フィッティングには Kaleidagraph 4.0; Synergy Software Technologies, Inc., Reading, PA を使用した．また，図中における各パラメータの単位は $Ts_{\max}$ および $Tc$ は mmol・$m^{-2}$・$s^{-1}$，$k$ は $s^{-1}$ である．）

検鏡材料（ここでは植物体の葉面）にスンプ液（酢酸アミルエステル）を塗布したスンプ板（セルロイド板）を貼り付けて乾燥させ作成したレプリカを用いて，検鏡材料の表面構造を顕微鏡で観察する方法のことである．$k$についてはいずれの場合も乾燥に対する気孔の反応速度を表しているが，確認の結果，わずかながら気孔が閉じきっていなかった場合は，$Ts_{max}$は「気孔の開閉により調節可能な範囲内での最大気孔蒸散速度」，$Tc$は「クチクラ蒸散速度と気孔を最大限閉鎖しても生じてしまう気孔蒸散速度の和」を表していることになる．この場合，気孔蒸散速度とクチクラ蒸散速度の完全な分離とはならない．しかしながら，いずれの場合においても，これら3つのパラメータは植物生理に関する分野において非常に有意義な生理特性を表現しており，高い利用価値があるだろう．

### 3.3.3　失水曲線を用いた評価の意義

失水曲線はある一定の制御条件下における水分供給の無い状態での脱水過程を表現している．そのため，この曲線の形は乾燥に対する気孔応答だけでなく，供試植物体の貯水量によっても影響を受ける．したがって，この曲線から，個葉レベルあるいはシュートレベルといった各レベルにおいて，蒸散に関する種特性を評価することが可能であると同時に，供試植物体のサイズを様々に変化させることにより，気孔応答といった蒸散特性に対して貯水量が与える影響についても評価が可能だろう．また，失水に伴う水ポテンシャルの変化とも関連づけた解析を行うことにより，蒸散特性および貯水評価の上で更に発展的な解析も可能となるだろう．

## 引用文献


1）B. Huber, *Ber. dtsch. bot. Ges*. **45** (1927) p.611.
2）L. A. Ivanov, *Lesn. Zh.* **48** (1918) p.1.
3）L. A. Ivanov, *Ber. deut. bot*. **46** (1928) p.306.
4）Y. Fukuda, *Pflanzenforsch.* **10** (1935) p.1.
5）G. Hygen, *Physiologia Plantarum* **4** (1951) p.57.
6）G. Hygen, *Physiologia Plantarum* **6** (1953) p.106.
7）B. Slavik, Methods of studying plant water relations, ed. B. Slavik, Springer-Verlag, New York, (1974) p.236.
8）A. R. Nejad, and U. Meeteren, *Physiologia Plantarum* **125** (2005) p.324.

# 4．藻類の光合成関連測定
## a．海洋と湖沼における光合成・環境要因の測定法

鈴木　祥弘[1)]

海洋での国際共同研究では中心となる測定項目について，共通の観測・測定手法が採用され，データの質と互換性が保障されている．本節では，共通手法のうち，本章の１，２節で陸上生態系について述べられたものに相当する部分を紹介し，さらに，溶存酸素による測定法について補足する．

## An introduction to universal protocols for estimation of primary productions and environmet factors in lakes and ocean.

Yoshihiro Suzuki

In international projects to study primary productions and ocean carbon flux in the ocean, universal protocols for the core measurements were adopted for quality-guaranteed and comparable data sets in each experiment. One of these universal protocols in JGOFS will be introduced, here. Some additional protocols for estimating dissolved $O_2$ will be explained.

### 4.a.1　概説

国際共同研究での共通手法

海洋では陸上に匹敵する光合成が行われている[1)2)]．また，海洋で行われる光合成は，「生物ポンプ」と呼ばれる機構の主要素であり，大気 $CO_2$ の海洋の中・深層への移動を促進する働きを担っている[1)]．このため，海洋で行われる光合成とそれを支える微細藻類の生物量（バイオマス）や光合成に影響を与える環境要因について，多くの測定と研究が精力的に行われていることは，全球海洋フラックス合同研究計画（Joint Global Ocean Flux Study, JGOFS; http://ijgofs.whoi.edu/）や世界海洋循環実験計画（World Ocean Circulation Experiment, WOCE; http://www.noc.soton.ac.uk/OTHERS/woceipo/ipo.html），これに付随する様々なプロジェクトとその成果からも明らかである．既に終了しているこれらの研究はさらに発展継承され，2008 年 11 月現在，全球海洋観測システム計画（Global Ocean Observing system, GOOS; http://www.ioc-goos.org/）などのプロジェクトが推進されている．

これら全地球規模の共同研究では，相互比較のためのデータの互換性と質の保障が重要である．このため，プロジェクトでは共通の観測・測定手法が採用される．こうした手法をまとめたものに Protocols for the Joint Global Ocean Flux Study（JGOFS）Core Measurements（全球海洋フラックス合同研究（JGOFS）における観測・測定手法，以降 JGOFS-Protocols）がある．改訂版が http://ijgofs.whoi.edu/Publications/Report_Series/reports.html ＃No.19 に公開されており，また，日本語翻訳版は 1995 年に日本海用データセンターから刊行されている．JGOFS-Protocols には本書の(2)の１，２で述べられた陸上生態系での測定を海洋で行うための手法が記されており，湖沼や河川などの陸水を含む水界での測定において標準的な手法として参考にすべきものである．本節では，JGOFS-Protocols 日本語版を利用するのに必要な簡単な説明を行い，さらに，溶存酸素の測定に関して説明を付け加えるものとする．

海洋での環境要因とバイオマスの測定

海洋での光合成や環境要因の測定は，基質である水の特性により，陸上での測定と異なる点がある．海洋では水深とともに様々な環境要因が変化する[3)]．たとえば，水の光吸収により，水深とともに光強度が低下し，水の吸光特性により光質が鉛直方向に変化する．海域により溶存成分や懸濁粒子が異なるため，光強度や光質の変化は海域により異なる[4)]．また，吸収した光で暖められた表面の海水と深部の海水には温度と密度に差が生じる．さらに，風や波浪，結氷などによって海水が撹拌されて鉛直方向の環境勾配は複雑に変化する[3),5)]．これに対応して微細藻類が増殖することで，光，栄養塩類，無機炭素や有機炭素，酸素濃度などの環境要因の勾配はさらに複雑に変化することになる．このような鉛直方向の環境勾配を測定するために海洋では CTD センサー（Conductivity

1）神奈川大学理学部

(電気伝導度)，Temperature (温度)，Depth (圧力，水深))に加えて様々なセンサーを装備し，複数の採水器(目的によりニスキン採水器や GO-FLO 採水器が使われる)をロゼット型に配置した機器をウインチで海中に降下させて測定を行う．装備された溶存酸素計(D. O.メーター)やクロロフィル蛍光測定装置のデータは，採水された試水で測定された D. O.や試水中のプランクトンのクロロフィルａ濃度と比較・校正されて利用される．採水された試水を用いて，塩分，ウィンクラー方による溶存酸素の測定，電量滴定法による全無機炭素濃度の測定，硝酸塩・亜硝酸・リン酸・反応性ケイ酸塩の定量などの環境要因や，分光法や蛍光分析法によるクロロフィルａとフェオ色素，粒状有機炭素と粒状窒素，溶存有機炭素などのバイオマスの測定が行われる (JGOFS-Protocols 参照)．

海洋での光合成・一次生産の測定

一般に光合成反応は水と $CO_2$ から炭水化物を生成する以下のような反応で表される．

$$6CO_2+12H_2O\rightarrow(CH_2O)_6+6H_2O+6O_2$$

この式から明らかなように，光合成は $CO_2$ の吸収や $O_2$ の発生により測定が可能である．実際には，光合成と平行して行われる呼吸により発生する $CO_2$ の放出や $O_2$ の吸収の速度 (R) によって，見かけ上の $CO_2$ の吸収や $O_2$ の発生の速度 (純光合成速度；Pn) は，光合成で生じる $CO_2$ の吸収や $O_2$ の発生の速度 (総光合成速度；Pg) より低い値を示す．この関係は，

$$Pg=Pn+R$$

の式で表すことができる．無機炭酸イオンが比較的高濃度で存在する海洋では，通常，光合成が $CO_2$ の不足で制限されることは無く，光依存性の呼吸や $O_2$ の消費は比較的小さいと考えられている[2]．このため，光照射下の呼吸速度と遮光条件下での光合成速度が等しいものと仮定して，R と Pn に加算することで Pg が求められることが多い．一方，陸上植物以上に考慮しなければならない問題に，光合成による $O_2$ 発生と $CO_2$ 吸収の比である光合成商 (PQ) がある．陸上植物は光合成産物の多くを澱粉などの炭水化物として蓄積し，セルロースなどの炭水化物を主成分とする幹や枝などの膨大な支持組織を形成する．これに対し，海中の微細藻類はその多くを光合成を行う細胞の形成に使う．このため微細藻類は蛋白質として大量の窒素原子を含み，C:N は 7 以下 (通常 C:N:P＝106：16：1 Redfield ratio)に抑えられている．多くの場合，この窒素原子は硝酸塩から同化されるため，これに伴って $O_2$ が発生することになる．C:N 比が約 7 のバイオマスが形成される場合でも，

$$0.71CO_2+0.59H_2O+0.101HNO_3\rightarrow0.71\text{バイオマス}+O_2$$

となる．すなわち 1.00 mol の炭素を同化するために，1.41 mol の $O_2$ が発生することになる (PQ＝1.41)[6]．微細藻類で光合成により固定されたエネルギーを考える場合には，$CO_2$ の取り込みよりも $O_2$ の発生により求められた速度の方が適切であることが分かる．

光合成速度・一次生産速度は C に基づいて $CO_2$ 濃度変化や炭素同位体の $^{14}C$，$^{13}C$ の取り込み速度として測定されたり，$O_2$ に基づいて溶存 $O_2$ の変化として測定されたりするが，目的に応じても使い分ける必要がある．さらに，粒状有機炭素やクロロフィル濃度などのバイオマスの変化 (JGOFS-Protocols 参照) や人工衛星からの海色データに基づく表層のクロロフィル濃度の変化からも一次生産速度が見積もられる[2]．

## 4.a.2 溶存酸素濃度の変化に基づく光合成速度の測定

溶存酸素濃度の変化を測定する方法として，1. $O_2$ 電極法による電気的測定　2. 蛍光錯体を用いた分光学的測定　3. ウィンクラー法による化学的測定が挙げられる．ここではこれらの方法の簡単な特徴を挙げる．ウィンクラー法については次節で実際の測定法を述べる．

$O_2$ 電極法による電気的測定

$O_2$ 電極法は．溶存酸素をクラークタイプの電極で検出する方法[7]で，上述の海中に降下する D. O. メーターにも利用されている．培養細胞などの光合成速度の測定に用いられる電極は，薄いテフロン膜を用いることなどにより，感度や応答性が高く，校正を頻繁に行うことで僅かな酸素濃度の変化を正確に測定することが可能である (2.c 参照)．植物の単離葉緑体を用い Hill 反応などの実験に用いられるのもこのタイプの測定装置である．$O_2$ 電極では測定に伴い陽極の Ag が酸化され，同時に試水中の $O_2$ が消費される．測定条件でバックグランドとして電極の $O_2$ 消費速度を求めておくことや電極の内部抵抗が変化しシグナルがドリフトすることに注意する必要がある．

蛍光錯体を用いた分光学的測定

$O_2$ 電極とほぼ同じ利用法が可能なものに，酸素濃度により蛍光強度の変化する蛍光錯体を塗布した光ファイバーセンサー (Pst3 oxygen sensor，ドイツ PreSens 社；http://www.presens.de/) がある．蛍光錯体セン

サーは 0 －500％大気飽和（すなわち 0 －100％濃度）の酸素濃度が気相でも液相でも測定可能であり，酸素濃度の時間変化を PC ソフト上で詳細に追跡することが可能である．頑丈センサーは，土壌中に差し込むことも可能であり，センサー自身が $O_2$ を消費することがないため，$O_2$ 電極よりも簡便に測定ができる．近年，呼吸などの測定に利用される例が増えている[8),9)]．

ウィンクラー法

Winkler の化学的な溶存酸素濃度測定法を，光合成速度の測定に応用するものである．通常は 4.a.3 で述べる明暗瓶法での溶存 $O_2$ の測定に用いられるが，現在最も良く利用されるのは，水質の代表的指標である化学的酸素要求量（Chemical Oxygen Demand, COD）や生物化学的酸素要求量（Biochemical oxygen demand, BOD）の測定に対してである．培養前後のある時点での酸素濃度を求めるものであり，培養中の酸素濃度変化やそれにより求められる光合成速度の時間変化を見ることはできない．しかしながら，1．BOD や COD の測定と機材を共有でき，機材が比較的安価であること，2．環境中とほぼ同じ条件で長時間培養が可能であり，生物に負荷をかけること無く長時間の測定が可能である明暗瓶法に適用されること，3．酸素濃度の測定であり，硝酸同化や呼吸も考慮できることなど，有用な点も多い．

## 4.a.3　ウィンクラー法と明暗瓶法による光合成測定の実際

### 4.a.3.1　ウィンクラー法

以下に述べる溶存酸素濃度の化学的測定法は，Winkler の方法を実際の光合成の測定に適用した Lobban ら (1988)[10)] や渡辺（1981)[11)] の方法に基づいている．

分析の原理

強いアルカリ性の下で $Mn(II)^{2-}$ は，$Mn(OH)_2$ の白色沈殿を形成する．この際，$Mn(OH)_2$ は，溶存酸素と化学的に結合して，第二水酸化マンガン（$MnO(OH)_2$）の茶褐色の沈殿物を形成する．現場で試水に塩化マンガンとヨウ化カリ・苛性ソーダ溶液（後述）を加えて十分に反応を進めると，全ての溶存酸素はこの沈殿に取り込まれ固定される．これらの沈殿は比較的安定であり，空気から遮断した瓶中，冷暗所で一定期間保持できる．

実験室へ移動後，試水を硫酸(塩酸)で pH 1.0～2.5 の酸性にすると，沈殿した水酸化物が溶解して，Mn(Ⅲ) イオンが遊離し，予め加えてあったヨウ素イオンをヨウ素に酸化する．このヨウ素は，周囲の過剰なヨウ素イオンとともに錯体を形成する．この錯体が存在する間は，平衡状態で遊離されたヨウ素により，ヨウ素・澱粉反応による青紫色の呈色が見られる．チオ硫酸イオンを加えると，この錯体は再び還元されてヨウ素イオンとなる．青紫色を消すのに必要なチオ硫酸イオンの量により，生じた $MnO(OH)_2$ の量を求めることができる．分光器によりヨウ素錯体の紫外部の吸収を測定して，チオ硫酸イオンにより生じたヨウ素錯体の消失検出し，自動的に酸素量を求める方法もある．上記の反応に対する化学等量式は以下のとおりである．

$$Mn^{2+} + 2OH^- \rightarrow Mn(OH)_2$$
$$Mn(OH)_2 + 1/2O_2 \rightarrow MnO(OH)_2$$
$$MnO(OH)_2 + 2I^- + 4H^+ \rightarrow Mn^{2+} + I_2 + 3H_2O$$
$$I_2 + I^- \rightarrow I_3^-$$
$$I_3^- + 2S_2O_3^{2-} \rightarrow 3I^- + S_4O_6^{2-}$$

滴定に用いるチオ硫酸塩は大気中で酸化されて，その組成が変わるので，1 次標準物質（ヨウ素酸カリウム）で滴定直前に標定する必要がある．ヨウ素酸カリ $KIO_3$ を正確に秤量してメスフラスコで溶解し，正確な濃度の溶液を得る．この溶液一定体積をビーカーにとり，KI の結晶を添加すると，$KIO_3$ 一分子につき三分子の $I_3^-$ が生じて，溶液が赤褐色に染まる．これに適量蒸留水を加えて濃度を調整し，チオ硫酸ナトリウム水溶液で滴定すると，滴定に要した量から，チオ硫酸イオンの濃度が算出される．上記の反応に対する化学等量式は以下のとおりである．

$$KIO_3 + 8KI + 6H^+ \rightarrow 3I_3^- + 3H_2O + 9K^+$$
$$I_3^- + 2S_2O_3^{2-} \rightarrow 3I^- + S_4O_6^{2-}$$

試薬

塩化マンガン水溶液：

$MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 150 g を蒸留水（D. W.）に溶かし，最終的に 250 ml とする（塩化マンガンの代わりに硫酸マンガンを用いても良い）．褐色のプラスチック瓶中で保存する．

ヨウ化カリ・苛性ソーダ溶液：

NaI 150 g を 150 ml の D. W. に溶かす．もし，溶液の色が黄褐色に着色したら，改めて作り直す．水で冷やしながら NaOH 80 g を加え，最終的に D. W. で 250 ml とする．褐色のプラスチック瓶中で保存する．

これら二溶液は試料に添加する際の作業で，試水などにより汚染され易い．使用前に，小瓶（50 ml ファルコンチューブなど）に分注して用いると良い．

濃硫酸（濃塩酸）：

100 ml の D. W. に 100 ml の濃硫酸（濃塩酸）（特級）をゆっくりと加えて希釈する．明暗瓶法への利用では塩酸

で代用できる場合が多いが，酸化還元反応をともなうBODやCODの測定には適さない．

呈色用澱粉溶液：

可溶性澱粉 0.25 g に D. W. 25 ml を徐々に加え，ガラス棒などで撹拌し糊状にする．これに沸騰した D. W. 25 ml を加えてさらに撹拌して調整する．

チオ硫酸ナトリウム：

酸素濃度や培養瓶の容量に合わせて，滴定の精度が維持できるよう適切な濃度に調整する．$Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$ 2.5 g を D. W. 1000 ml に溶解すると約 10 mM の溶液が調整できるが，小容量の試料に用いる際は，より希薄な溶液を用いると充分な容量を滴下できる．

ヨウ素酸カリウム標準液：

デシケーターで充分乾燥させた $KIO_3$ を正確に秤量し，メスフラスコ中で D. W. を加え正確に 1000 ml とする．(356.7 mg を秤量すると 10.mM の溶液が得られるが，この前後の重量で正確な濃度が求めれば，計算の際に補正できる)．

装置

試料固定用マイクロピペッター：1000 $\mu$l を正確に測定できるもの．チップを交換して使っても良いが，できれば塩化マンガン水溶液とヨウ化カリ・苛性ソーダ溶液用に 2 本用意する．

マグネチックスターラーと撹拌子

デジタルビュレット：先端に適切な口径のシリコンチューブを取り付けて，試料の底に直接，チオ硫酸ナトリウム溶液を入れられるようにする．

滴定箱：終点を見易くするため，白色の板などでスターラーを囲えるようにしておく．照明も終点の見やすいものを工夫する．

廃液入れ：ポリタンクにプラスチックの漏斗などをつけておく．廃液は強酸性なので注意が必要である．

操作

チオ硫酸ナトリウム溶液の濃度

- チオ硫酸ナトリウム溶液の入った瓶にデジタルビュレットを設置し，ビュレットの先端に硬質のシリコンチューブを接続しておく．チューブの先までチオ硫酸ナトリウム溶液を満たし，ビュレットの操作とともに先端から溶液が流れ出るようにする．
- マイクロピペッターまたはホールピペットを用いて，ヨウ素酸カリウム標準液 10 ml を滴定用ビーカに正確にはかりとり，ヨウ化カリの結晶を少量加える．側壁についた標準液を洗い落とすように，約 2 ml の濃硫酸(濃塩酸)溶液を加えると，ヨウ素が生じ赤褐色になる．
- ビーカーにビュレットに取り付けたチューブの先端を入れ，滴定を開始する．ビーカー中の撹拌子を回転させながら，予想される終点付近の容量までチオ硫酸ナトリウムを加えると赤褐色が薄くなる．ここで呈色用澱粉を加えると青紫に呈色する．濃い赤褐色のままで澱粉を加えると，色が消えるまでにタイムラグが生ずる場合があるので注意する．この場合，終点付近で慎重に滴定を行う必要がある．青紫色が消えるまで，さらに少量ずつチオ硫酸ナトリウムを加える．
- 終点までに必要とした液量から濃度の決定が決定できる．
- 撹拌子を外側から磁石などで固定し，廃液を廃液入れに集める．ビーカーを D. W.で 2 度リンスし，次の実験に用いる．リンスした廃液は廃液入れに捨てる．

酸素の固定

- 試水を細口瓶にとる (4.a.3.2 参照)．細口瓶の蓋を取り，塩化マンガン 1000 $\mu$l とヨウ化カリ･苛性ソーダ溶液 1000 $\mu$l を加える (50－60 ml 細口瓶の場合，瓶の容量に応じて加える試薬の量は調整する)．この際，マイクロピペッターのチップの先端を水中に十分に浸し，気泡が水中に混入しないように留意する．
- 気泡が入らないように思い切って蓋をする．躊躇しながら蓋をすると気泡が入る．気泡が入った場合にはふたを開け，再び 2 種類の試薬を加えてから，蓋をする．加えた試薬の量は記録しておく．加えた試薬の容積分だけ試水の体積が減少したと考えて計算する．
- 気泡が入らないように注意し，強く栓を抑えながら瓶を激しく振る．十分に撹拌して全ての酸素を固定する．
- 細口瓶は冷暗所で，(培地に合わせて)水または海水に浸けて，瓶を立てたままで静置しておく．沈殿が沈んだ時点でもう一度激しく振って，溶存酸素を完全に固定する．
- 細口瓶を冷暗所で，(培地に合わせて)水または海水に浸けて，瓶を立てたままで静置し，6 時間以上放置する．

ヨウ素イオンの酸化

- 沈殿を底に沈めたまま，静かに細口瓶を取り出し，口周辺の水を拭き取る．
- 栓を開け，沈殿が上層に拡散しないよう注意しながら，静かに濃硫酸（濃塩酸）1 ml を加え，気泡が入らないように栓をする．
- 瓶を良く振り，全ての沈殿が溶解して溶液が褐色透明になったことを確認する．

ヨウ素イオンの滴定

- 細口瓶から滴定用のビーカーに試水を完全に移す．硫酸で共洗いしても良い．

・チオ硫酸ナトリウム溶液の入った瓶にデジタルビュレットを設置し，ビュレットの先端に硬質のシリコンチューブを接続しておく．チューブの先までチオ硫酸ナトリウム溶液を満たし，ビュレットの操作とともにチューブの先端から溶液が流れ出る様にする．
・ビーカーにビュレットに取り付けたチューブの先端を入れ，滴定を開始する．
・ビーカー中の撹拌子を回転させながら，予想される終点付近の容量までチオ硫酸ナトリウムを加える．ここで呈色用澱粉を加え，青紫色が消えるまでさらに少量ずつチオ硫酸ナトリウムを加える．終点までに必要とした液量から濃度の決定が決定できる．
・撹拌子を外側から磁石などで固定したまま，廃液を廃液入れに集める．強い酸性であることに注意する．集めた廃液は炭酸水素ナトリウム（工業用の安価なものでかまわない）を過剰に加えて，弱アルカリ性にしてから廃棄する．

#### 4.a.3.2　明暗瓶法

原理

明暗瓶法は二本の瓶に光合成生物を含む試料を封入し，一本に光を当てて光合成を行わせ(明瓶)，もう一本の瓶を遮光して光合成を行わせずに(暗瓶)，適切な時間培養する方法である．その間に二本の瓶に生じた差から光合成速度が求められる．通常は明瓶，暗瓶ともに各三本以上用いる．培養開始時の状態を測定するために，明瓶暗瓶以外にもう一組の瓶を用意することもある．光合成により生じる変化として，溶存酸素濃度，溶存無機炭素濃度，$^{13}C$ や $^{14}C$ の生物（懸濁粒子）への取り込み，生物量（クロロフィル濃度）の変化などが測定される．この変化は単位容積あたり，単位生物量あたりの変化に換算され，単位時間あたり（時，日，年）の速度として求められる．瓶中の環境変化が光合成や呼吸に影響を与えないよう，試料の濃度や培養時間は十分に考慮する必要がある．海洋や湖沼の単位面積あたりの生産速度に換算されることもある．海洋や湖沼の現場培養に関してはJGOFS protocols を参照していただきたい．ここでは実験室において液体培地中で培養中の微細藻類の 1 日の光合成速度を求める方法を例示する．

材料

培養中の微細藻類：培地 2000 ml 中で対数増殖期にある細胞を用いる．

低速スターラーと撹拌子：

シリコンチューブ（直径 5 mm 程度）50 cm

プラスチックバット：

共栓付き細口試薬瓶：希塩酸に 1 日以上つけて重金属を除き，十分に洗浄したもの．乾燥重量と D. W.を満たした状態の重量の差から，容積を正確に求めておく．測定した際の共栓と瓶の対応付けをしておく．12 本

温度制御可能な水槽：培養中に空気が入らないように，培地の基質（水や海水）を入れておき，培養温度と同じ温度にしておく．

照明：培養に用いている照明を使う．光強度は適切に調整する

方法

・培養中の微細藻類をスターラーで静かに撹拌し，均一に混ぜる．
・シリコンチューブを用いて，サイフォンで細口瓶に微細藻類を移す．チューブの先端を瓶の底付近まで差し込んで，培地を流入させる．
・細口瓶はバットの上に置く．瓶に培地が充たされてもそのまま移動を続け，瓶の上部より培地をあふれさせる．瓶の容積の 2 倍程度あふれたところで，チューブを取り出しながら送液を停止する．
・細口瓶 12 本に順次培地とそれに含まれる微細藻類を充たす．
・気泡が入らないように注意しながら，すべての瓶に栓をする．
・12 本から無作為に 4 本ずつ選び，3 組に分ける．
・１組に黒色ビニール（アルミホイル）を巻き遮光する．もう一組とともに水槽に立てたまま沈め，照明を当てて培養を開始する．
・残った一組(イニシャル瓶)のうち三本にウィンクラー法の試薬を添加して，溶存酸素を固定する．残りの一本はバイオマスの測定に用いる．(濾過後，有機溶媒で抽出し，蛍光法や分光法でクロロフィル濃度を決定する．細胞あたりの速度を算出する場合には，細胞密度を顕微鏡観察で求める．)
・培養後，明瓶と暗瓶，各三本で溶存酸素を固定し，残った各一本でバイオマスを測定する．
・培養中に生じた明瓶とイニシャル瓶の差，暗瓶とイニシャル瓶の差から純光合成量と呼吸量を求める．
・培養後のバイオマスの変化を考慮し，培養期間中に対数増殖していることを仮定して，培養期間中の平均バイオマスを求める．
・光合成量と呼吸量を培養時間と平均バイオマスで換算して，単位生物量，単位時間あたりの純光合成速度(Pn)と呼吸速度(R)とし，両者から総光合成速度(Pg)を算出する．
・明暗周期をつけて培養している場合には，この周期にあわせて実験を行う．暗期の呼吸を同様に求めると，

1日あたりのPn，R，Pgを求めることが出来る．

## 参考文献


1）The Carbon Cycle (Office for Interdisciplinary Earth Studies Global Change Institute, Volume 6), ed. T. M. L. Wigley, D. S. Schimel, Cambridge Univ Pr (Sd), 2000, p. 38-49.

2）Aquatic photosynthesis, Paul G. Falkowski, John A. Raven, Blackwell Science, 1997, p.1-32.

3）Biological oceanography, Carol M. Lalli and Timothy R. Parsons, Oxford [England]; Butterworth Heinemann, 1997.

4）Light and photosynthesis in aquatic ecosystems, John T. O. Kirik, Cambridge: Cambridge University Press, 1994.

5）Polar Marine Diatoms, Linda Medlin, Julian Priddle, Balogh Scientific Books, 1990.

6）Algal photosynthesis, Richard J. Geider and Bruce A. Osborne, New York: Chapman and Hall, 1992.

7）The use of the oxygen electrode and fluorescence probes in simple measurements of photosynthesis, David Walker, Oxygraphics Ltd, 1990

8）New and Fast Method To Quantify Respiration Rates of Bacteria and Plankton Communities in Freshwater Ecosystems by UsingOptical Oxygen Sensor Spots, Mareike Warkentin, Heike M. Freese, Ulf Karsten, and Rhena Schumann, APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, Nov. 2007, p.6722-6729.

9）A new method for continuous measurements of O2 in surface water in combination with pCO2 measurements: Implications for gas phase equilibration, B. Schneider, B. Sadkowiak, F. Wachholz, Marine Chemistry **103** (2007) 163-171

10）Experimental phycology, [edited by] Christopher S. Lobban, David J. Chapman, Bruno P. Kremer; sponsored by the Phycological Society of America, Cambridge; Cambridge University Press, 1988. p.64-82.

11）水圏における光合成および一次生産の測定法，渡辺泰徳，光合成研究法（加藤栄，宮地重遠，村田吉男編），共立出版株式会社，1981，p.110-138．

# 4．藻類の光合成関連測定
## b. ガスクロマトグラフィーと酸素電極を用いた無機炭素親和性の測定

大西　紀和[1)*]，福澤　秀哉[1)]

炭酸固定を研究する上で，溶存無機炭素に対する親和性を評価することは，生物がどのように$CO_2$を利用しているのかを知る上で重要である．微細藻類の$CO_2$（無機炭素）濃縮機構を研究する上で重要なガスクロマトグラフィーを利用した無機炭素親和性の測定法を紹介する．

## A Method for photosynthetic affinity against inorganic carbon using gas chromatography and oxygen electrode.

Norikazu Ohnishi, Hideya Fukuzawa

In order to understand how the photosynthetic organisms utilize carbon dioxide, it is important to evaluate the photosynthetic affinities against inorganic carbon. Especially microalgae efficiently utilize carbon dioxide by inducing carbon-concentrating mechanisms. We described a refined method to measure the photosynthetic affinity using gas chromatography and oxygen electrode.

### 4.b.1　はじめに

炭酸固定酵素ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase（RubisCO）は，1分子のリブロース-1,5-ジリン酸と3分子の$CO_2$と3分子の水分子から，2分子の3-ホスホグリセリン酸を生成するカルボキシラーゼ反応に加えて，2分子のリブロース-1,5-ジリン酸と2分子の酸素から2-ホスホグリコール酸と3-ホスホグリセリン酸を生成するオキシゲナーゼ反応も触媒する．光合成生物にとって，本酵素の$CO_2$に対する親和性と$O_2$に対する親和性の違いは炭酸固定能を規定する大きな要因である．また，RubisCOの$CO_2$に対するKm値は，陸上植物に比べて水生光合成生物は，高い値を示すことから，$CO_2$を有効に利用するために無機炭素（Ci；$CO_2$と$HCO_3^-$）濃縮機構（carbon-concentrating mechanism：以下CCMと略す）をもつことが知られている（図1）．このCCMはCi欠乏環境において誘導され，細胞膜や葉緑体胞膜における輸送体と細胞の各コンパートメントに局在する炭酸脱水酵素によって構成されており，Rubisco周辺に$CO_2$を濃縮することで光合成の効率を維持する役割を担っている[1~3]．ここでは，CCMの総合的活性の指標として用いられる，ガスクロマトグラフィーと酸素電極を用いた細胞の無機炭素に対する親和性の評価方法を述べる．実験材料として緑藻クラミドモナスを使った場合について述べるが，本方法は，その他の藻類（ラン藻[4]，灰色藻[5]など）にも利用されている．ただし，測定結果を解析する際に利用する細胞濃度や酸素電極の温度等のパラメーターは，生物種ごとに設定する注意が必要である．

光合成における細胞の無機炭素（Ci）に対する親和性とは，細胞を酵素に例えて，どのレベルの光合成基質が最大光合成活性を与えるのかを測定して，$K_{1/2}$値（"K-half"と読む．$K_{0.5}$と表記することもある）として表記する．例えば，この$K_{1/2}$値が低ければ，CCMが作動しており細胞全体として，Ciに対して親和性が高い状態を示す

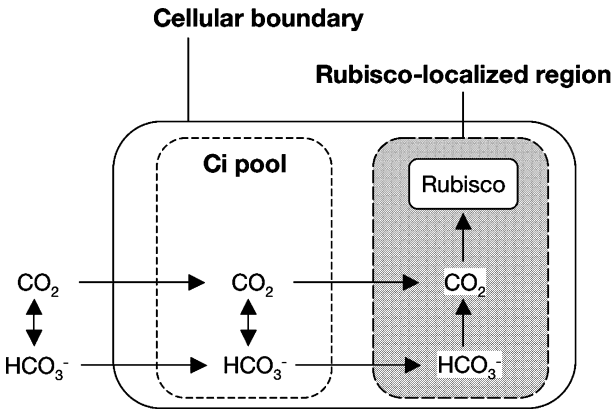



図1：微細藻類の無機炭素濃縮機構を示した概略図．細胞外から取り込まれた無機炭素（Ci；$CO_2$と$HCO_3^-$）は，Ci poolを経てRubiscoの局在するコンパートメント（カルボキシゾームやピレノイド）に輸送され，最終的に$CO_2$としてRubiscoに供給される．$CO_2$と$HCO_3^-$の交換反応には，炭酸脱水酵素が関与する（文献8参照）．

1）京都大学大学院生命科学研究科
（＊現　岡山大学大学院自然科学研究科）

と判断できる．本解析法は Ci 輸送も含めた細胞の光合成特性を知る方法である．

具体的には，培地中および細胞中の Ci を一旦枯渇させ，その細胞懸濁液に $NaHCO_3$ 溶液を徐々に加えていき，各濃度における酸素発生活性（Dissolved inorganic carbon (DIC)-dependent photosynthesis activity）を測定する．最大の酸素発生活性（Vmax）の 50%の活性を与える $NaHCO_3$ 濃度を算出し，これを $K_{1/2}$ 値とする．ただ，培地中および細胞中の Ci を，完全に除去する（枯渇させる）ことは難しい．定性的には，酸素発生速度をモニターして，新たな酸素発生が無くなった時点で「Ci は枯渇した」と仮定する場合もあるが，Ci に対する親和性の低い細胞の場合は，酸素発生が停止するまでに時間を要するので，その間に細胞の生理状態が変化してしまう可能性がある．そこで，酸素発生速度の測定を開始する時点での，細胞懸濁液における溶存 Ci 量を推定する必要がある．そのためには，細胞懸濁液に含まれる Ci を水素ガスと Ni 触媒（メタナイザー）を用いてメタンに還元し，これをガスクロマトグラフ（ガスクロ）（図 2）で定量する．この値を用いることで，初期 Ci 濃度を知ることができるので，低 Ci 濃度での光合成速度を正確に評価することが可能となる[6,7]．

実験では，酸素電極とガスクロを短時間のうちに並行して操作することになるので，正確な測定を行うには準備と慣れが必要である．また，測定当日に対数増殖期の細胞を使用する必要があるので，あらかじめ計画を立てて，細胞を培養しておく．測定前日には，測定用各種溶液（細胞懸濁用バッファーのストック溶液等）を調製する．測定当日には，(1)ガスクロの準備，(2)細胞懸濁用バッファーの調製（ガスクロの準備中に行う．前日までに行っても良い．）(3)酸素電極の準備（ガスクロの準備中に行う．一部は前日までに行っても良い．）(4)細胞の調製（ガスクロの準備中に行う．）を行い，測定する．器具等を片付けて得られたデータを解析する．ただし，測定当日は，まずガスクロの準備から始める．途中 2 時間程度の待ち時間があるので，酸素電極等の準備をする．

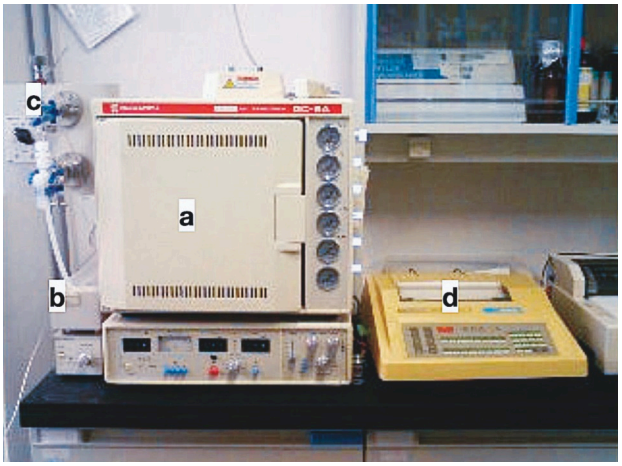



**図 2**：ガスクロマトグラフの全体像．a．本体，b．メタナイザー，c．ガラスセル，d．レコーダー．

## 4.b.2 器具・装置

- 酸素電極（英国 Hansatech Inst.製，国内では旭光通商株が「クロロラボ 1」として販売）
  測定チャンバーに飽和 KCl 溶液を入れて保管しておく事が多い．その場合は，コントロールボックスやレコーダーのスイッチを入れてみて，反応するようであれば新たに電極を組み直す必要は無い．酸素電極のセットアップについては，前項を参照する．
- 循環型恒温槽（EYELA 製，CCA-1111，28℃に設定）
- 励起光源（Megalight100, SCHOTT AG, Mainz, Germany；測定中に光強度を変えることができる装置が良い）
- ガスタイトシリンジ（先端が針状の物．ガイド付 10 μL 用 2 本と，100 μL 用，200 μL 用各 1 本）
- 酸素発生活性測定用レコーダー（YOKOGAWA 製，LR-4220；測定しながら $NaHCO_3$ 溶液を加えた点をマークしていくので，記録面が水平なタイプが良い．また，わずかな酸素発生量を正確に測定するために測定レンジを低めに設定する必要があり，かつ 1 回の測定に 10 分程度要するので，チャートの幅は 25〜30 cm 程度が必要）
- ガスクロクロマトグラフ（島津製メタナイザーMTN-1，レコーダー［クロマトパック C-R6A］を接続した GC-8A に特注のインジェクションセットを接続して使用．脚注[1)] 参照）
- 窒素ガス（ガスクロに接続するボンベとは別に準備し，HEPES バッファーの脱気と，Ci の枯渇に使用する．レギュレーターの後には二分岐コックを連結し，シリコンチューブを接続し，さらにその先端には，ピペットチップを付ける）
- 電動アスピレーター（ガスクロのカラムの洗浄に使用）

注1 メタナイザー前のガラスセルとインジェクションバルブの加工は，関西学院大学理工学部生命科学科の松田祐介先生による．

## 4.b.3　試薬類

・100 mM $Na_2CO_3$ 溶液（ガスクロマトグラフィーCalibration standard 用．メスフラスコで調製し，ゴム栓で密閉しておく）
・活性測定用 $NaHCO_3$ 溶液（20 mL 容量の三角フラスコ（3 本）に超純水をガラスピペットで正確に 20 mL を測り取り，$NaHCO_3$ を 1.26 g（750 mM），0.252 g（150 mM），0.025 g（15 mM）ずつ加えてスターラーで攪拌する．溶解したらゴム栓をして密閉しておく）（図 3）．
・細胞懸濁用 1M HEPES-NaOH（pH 7.8）（500 mL 程度．オートクレーブ処理する）．
・25%（v/v）$H_3PO_4$ 溶液（ガスクロ用）

## 4.b.4　実験

### 4.b.4.1　ガスクロマトグラフ（ガスクロ）の準備

1）本体とメタナイザーの電源を入れる（部屋の換気を忘れないこと）．
2）メタナイザーの調節つまみを回して，触媒温度（カタリシス）を 450°Cに設定する．
3）ガラスセル下のコックを閉じ，ガラスセルの横にあるツマミを CHARGE に合わせる．
4）ガスクロに接続した窒素，圧縮空気のガスボンベを開栓し，水素ガス発生装置（島津，OPGU-2100S）を始動する．
5）ガスクロ本体のツマミで各ガスの分圧を以下のように合わせる．圧力を間違えると 7）で点火できないので注意．

| | |
|---|---|
| $N_2$（PRIMARY）： | 500 kPa |
| $N_2$（CARRIER GAS 1）： | 280 kPa |
| $H_2$（HYDROGEN 2）： | 70 kPa |
| Air： | 5 kPa |

6）本体上部の左側の通気孔から点火する（図 4）．スパテルを使って蒸気が出ているのを見ることで，点火を確認する．スパテルが全く曇らないようであれば点火できていないので，点火し直す．
7）メタナイザー内の Ni 触媒を還元させるために，$H_2$ ガスを 1 時間半程度通気する（この間にバッファーの調製，酸素電極の準備等を行う）．
8）カタリシスを 400°Cに，Air の圧力を 50 kPa にそれぞれ設定し直す．
9）ガラスセルのツマミを INJECT に合わせ，100 μL の 25%　$H_3PO_4$ 溶液をマイクロシリンジでガラスセルの中で均一に広がるようにアプライする．均一に広がれば，全体が泡立つようになる（図 5）．アプライする時にガラスセルからの圧力でシリンジのピストンが押し上げられるので，ピストンから手を離さないようにする．
10）そのまま 1 時間以上放置しておき，この後にレコーダーの準備（次項）を行う．

### 4.b.4.2　ガスクロ用レコーダー（クロマトパック）の準備

1）電源を入れる．READY のランプが始めは点滅しているので，点灯するまで待つ．
2）〝SHIFT DOWN〟を押しながら〝I〟，〝N〟，〝I〟と入力し，〝ENTER〟を押して初期化を行う（〝INITIALIZED〟と印字される）．

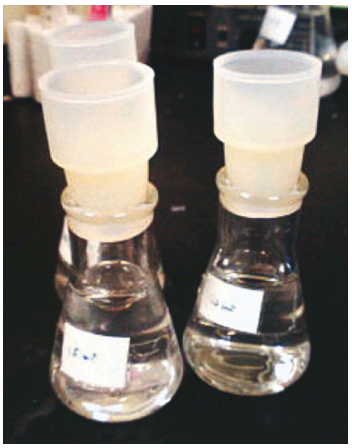


図 3：ゴム栓をした $NaHCO_3^-$ 溶液．密閉できていることが重要である．



図 4：ガスクロマトグラフへの点火の様子．点火口付近に火炎の先端を近づけて点火する．点火できると「ポン」と音がする．

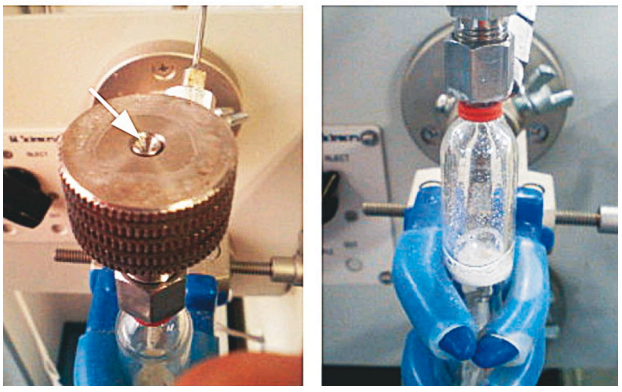



図5：ガスクロマトグラフに設置されたガラスセル．A．ガラスセルを上から見たところで矢印はマイクロシリンジの先端を挿入する場所を示す．B．ガラスセルに25%リン酸溶液をアプライしたときの様子．ガラスセルに均一に広がるとこのように泡立つ．

3）〝PRINT〞を押した後に，〝CTRL〞を押しながら〝LEVEL〞→〝ENTER〞の順でキーを押し，ゼロ点の値を印字する．

4）3200～3800 μV の範囲になるようにガスクロ本体の COARSE のツマミを回して合わせ，3）の手順で印字して確認する．

5）各パラメーターを以下のように設定する．

MIN AREA：　10
SLOPE：　200
SPEED：　10
ATTEN：　2

6）〝ZERO〞→〝ENTER〞と押して，レコーダーペンを原点に合わせる．

7）〝SHIFT DOWN〞を押しつつ〝S.TEST〞を押し，〝ENTER〞と入力し，ノイズテストを行う（50 秒）．

8）〝SHIFT DOWN〞を押しつつ〝PLOT〞を押し，〝ENTER〞を押す．チャートが進み始めるので，ベースラインが安定するまで待つ．正しく設定できていれば，この時点でレコーダーペンは少しずつ左に移動する．リン酸をアプライしてから十分時間が経っていれば，安定しているのでむしろレコーダーペンは左右には動かない（図6）．

9）ベースが安定したら，〝SHIFT DOWN〞を押しつつ〝PLOT〞を押し，〝ENTER〞でチャートを止める．レコーダーペンが大きく左に移動する場合は，20 分程度してから3）以降を再度行う．

### 4.b.4.3　Calibration standard の測定

溶存 Ci 量（DIC: dissolved inorganic carbon）を決定するために，Calibration standard として超純水と 200 μM $Na_2CO_3$ 溶液について Ci 量の測定を行う．

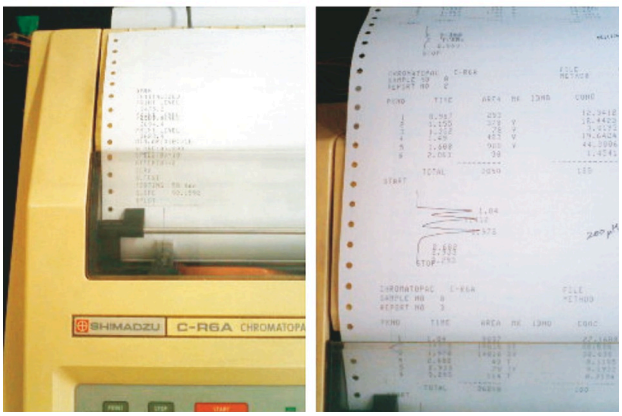



図6：ガスクロマトグラフのチャートレコーダーの様子．A．運転準備ができ安定したときの様子．レコーダーのペンは左に寄った状態で止まる．B．200 μM $Na_2CO_3$ 溶液を3回ガラスセルにアプライした後のチャートの記録結果．ピークの高さはほぼ同じ高さになる．

1）三角フラスコ（10 mL 容量）に，超純水をピペットで 10 mL 量りとっておく．

2）レコーダーの〝START〞を押し，測定を開始する．

3）1）のフラスコから超純水を 10 μL とり，マイクロシリンジでガラスセルにアプライする（$NaHCO_3$ 用の 10 μL マイクロシリンジを使って，10 秒間隔くらいで3回以上アプライする）．

4）レコーダーの〝STOP〞を押してチャートを止め，各ピークの面積（AREA）を算出させる．

5）1）のフラスコに 100 mM $Na_2CO_3$ 溶液をマイクロシリンジ（$Na_2CO_3$ 用の 50 μL タイプ）で 20 μL 加え，よく攪拌する（200 μM 溶液が調製できる）．

6）再びレコーダーの〝START〞を押して測定を開始する．

7）4）で調製した 200 μM $Na_2CO_3$ 溶液を，10 μL アプライする（$NaHCO_3$ 用の 10 μL マイクロシリンジを使って3回以上アプライする）．

8）レコーダーの〝STOP〞を押して，チャートを止める．

9）それぞれのピークの面積（AREA）が算出されるので，アプライ1回あたりのピーク面積の平均値を算出し，さらに以下の式により 1 μM の $Na_2CO_3$，10μL あたりの面積を算出する．

（[$Na_2CO_3$ 溶液の面積]－[超純水の面積]）/200

得られた値を 1 μM DIC とし，以降の解析に用いる．

10）7）で使用したマイクロシリンジ内に $Na_2CO_3$ 溶液が残らないように，洗浄用の超純水で 10 回以上洗う．

11）ガスクロのレコーダーの〝START〞を押してチャートをスタートさせ，10）で洗ったマイクロシリンジで 0 μM DIC 用超純水（細胞懸濁用バッファーの調製．

手順5）を参照）を10 μL取って測定する．Calibration standard測定時のものと比べて，ほぼ同じ大きさのピークが検出されれば良い．明らかに大きなピークが検出された場合は，シリンジ内に$Na_2CO_3$が残っていたので，更に超純水で数回洗浄し，再度測定する．

〈参考〉ガスクロで少量の液体をアプライする際の注意点

- 10 μLのマイクロシリンジは，先端が細く曲がり易い．これに対し，ガスクロのガラスセルのサンプル注入口は，抵抗があり径も小さいので，シリンジの針の挿入が難しい．10 μLのシリンジでアプライする場合は必ず針部分に手を添え，ゆっくりと挿入すること．挿入する方向によっては，途中で金属部品に突き当たってしまい，ガラスセル内まで針を挿入できないことがあるが，その場合は一旦引き抜き，再度方向を少し変えて挿入すること．
- 10 μLをアプライする場合に，サンプルがガラスセル内で四方に散ってしまいうと正確な測定ができない．正確な測定には，シリンジの中の液体の量が残り4 μL程度までは丁寧に（ゆっくりと）ピストンを下げてシリンジの先端に水滴を作り（図7），次に一気にまとめて液滴を真下のリン酸溶液に落とすようにする．液がカラムの壁面に飛散したら再度アプライする必要がある．

### 4.b.4.4　細胞懸濁用バッファーの調製

調製後のバッファーを放置しておくと大気中の$CO_2$が溶解してしまい，測定誤差が生じる．そこで，溶存Ci濃度を減らすため，バッファーの窒素置換（脱気）を行う（ガスクロ本体の準備中）．容器にゴム栓をしていても，測定前日には脱気しておく．



図7：ガスクロマトグラフのガラスセルに10 μLの$Na_2CO_3$溶液をアプライする様子．シリンジのピストンを少しずつ下ろして先端に液滴を作り，それから一気に全部落とすと少量でも正確に測定が可能となる．

1）1 M HEPES（pH 7.8）を200倍希釈して50 mM HEPES（pH 7.8）を用意し（100〜200 mL程度），更にこれと同量の超純水も用意する．

2）両液をホットスターラーで沸騰しない程度に熱し（フラスコの内壁に泡が付着する程度），撹拌しながら$N_2$ガスを通気する（図8 A）．この時，水分が蒸発し過ぎないように，かつ蒸気がある程度逃げるようにフラスコにラップをかけておく．水分が蒸発して体積が減るので，50 mM HEPES（pH 7.8）を入れたフラスコには，あらかじめペンで水位のところに線を引いておく．

3）脱気を1時間以上行った後（最初の半分近くまで体積が減っているはず），氷上で冷やしながら$N_2$ガスを通気する．

4）室温程度まで冷めたら，氷から出して$N_2$ガスを止める．50 mM HEPESの体積が減るので，$N_2$ガスの通気を止めてすぐに脱気を行った超純水を1）の水位まで加えて体積を合わせる．

5）50 mM HEPES（pH 7.8）は，ゴム栓をして（図8 B）室温に置く．残った超純水については，測定当日に調製した場合も0 μM DIC用としてゴム栓で密閉しておく．

### 4.b.4.5　溶存酸素濃度の測定

注意＊）酸素電極はセットアップ毎に感度が異なるので，レコーダーのチャートの目盛りがどの程度の酸素濃度に相当するかを実験毎に見積もる必要がある．酸素電極の掃除や組み直しは前日に行っても良いが，この溶存酸素濃度の測定は必ず測定当日に行う．

注意＊）測定に使うジチオナイト（Sodiumhydrosulfite，$Na_2S_2O_4$）は酸化されやすい物質なので，密栓して乾燥状態で保存する．

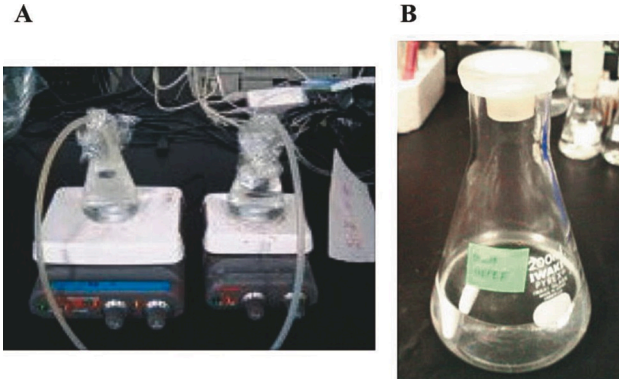



図8：バッファーの脱気と保存の様子．A．ホットスターラーに載せたフラスコに，窒素ガスをピペットチップを先端に付けたシリコンチューブで通気している．B．脱気後のバッファーはゴム栓の薄い部分を折り返して密栓する．

1）あらかじめ循環型恒温槽の電源を入れておき，28℃の水を測定チャンバーに循環させておく．
2）測定チャンバーからKCl溶液を除き，数回超純水で洗う．
3）調製直後の超純水（0 μM DIC用超純水）を1.5 mL入れる．
4）スターラーを回して，コントロールボックスに表示される値，またはレコーダーのペンの動きが安定するのを待つ（30分程度．少しづつ上昇するはず）．
5）レコーダーのレンジを5 Vまたは10 Vに，チャートスピードを1200 mm/hに設定する．
6）チャートをスタートさせ，Air-lineを30秒程度記録する．
7）測定チャンバーに，マイクロスパテルにすり切り一杯程度のジチオナイトを加え，すぐにフタをする（この場合は液面にフタの下部が接触しないようにする）．電極が正しくセットできていれば，すぐにレコーダーのペンは左に動く（図9）．
8）1分以内に電位が安定するので，この値を$N_2$-lineとする．安定したら記録を停止し，直ちに測定チャンバーを超純水で10回以上洗う．ジチオナイトはテフロンメンブレンを傷める上に，洗浄が不十分だと測定は失敗する．
＊電極の応答が遅いと，電位は1分以内に安定しないので，電極を組み直す．組み直しても1分以内に電位が安定しない場合は，ジチオナイトが酸化されている可能性もあるので，別のロットに交換する．ジチオナイトを加えたところでAir-lineに対して直角にペンが移動して2～3分以内にほぼ平衡に達するようであれば良い．チャートスピードを遅くすることは解決にはならない．
9）Air-line（$O_2$濃度は下表参照）から$N_2$-line（0 μM $O_2$）までの電位差をチャート上で定規を使って測り，1 mmあたりの酸素量を推定する．Air-lineにおける酸素量を，表1に示す．通常は25℃で計算して問題無い．
10）測定までに少し間がある場合は，飽和KClを1 mL入れておき，メンブレンの乾燥を防ぐ．

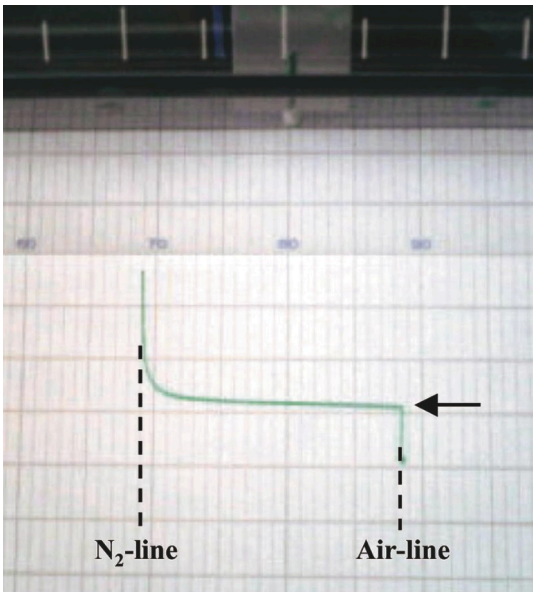



**図9**：レコーダーの測定レンジを5 Vに設定した際のAir-$N_2$ line．矢印はジチオナイトを加えた時を示す．

**表1**：15－30℃における溶存酸素濃度

| 温度（℃） | 15 | 20 | 25 | 30 |
|---|---|---|---|---|
| 溶存酸素量（μM） | 313 | 286 | 254 | 228 |

### 4.b.4.6　細胞の調製

ガスクロの準備からレコーダーの準備までが完了してから（レコーダーに表示される数値が安定していることを確認しておく），脱気済の50 mM HEPESバッファーを用いて，測定用の細胞を調製する．カラムにリン酸溶液をアプライしてからの時間によっては，初期値が十分安定しないことがある．

1）50 mL培地でOD 730＝0.2～0.4まで培養した細胞を，700×gで5分，28℃で遠心して集める．
2）培地を残さないように，上清を捨てる．
3）脱気した50 mM HEPES（pH 7.8－KOH）で懸濁する（下記の注意を参照）．この時，OD 730＝1の細胞は約10 μg Chl $mL^{-1}$であるので，理論上最終濃度が20 μg Chl $mL^{-1}$よりも少なめの量に懸濁する．

〈注意〉脱気したHEPESバッファーはゴム栓をしたままの状態で，以下の手順で18 Gの針を付けたシリンジ（15 mL容量）をゴム栓中央付近に突き刺して取る．

〈手順〉
－a．シリンジで$N_2$ガスを，細胞を懸濁するバッファーの量分だけ吸う．
－b．そのままの状態で，バッファーの入ったフラスコのゴム栓に突き刺す．
－c．シリンジ中の$N_2$ガスをフラスコ内に押し出す．
－d．フラスコを逆さにしてシリンジの針の先端がバッファーに浸るようにして，必要量のバッファーを吸い取る．
－e．シリンジの針をゴム栓から抜く．

4）クロロフィル濃度を定量する．15～20 μg Chl $mL^{-1}$

であればそのまま実験に使う．濃い場合は 20 μg Chl mL$^{-1}$ に希釈し，再度定量する．15 μg Chl mL$^{-1}$ 未満の場合は遠心からやり直す．

#### 4.b.4.7 溶存無機炭素に依存した光合成活性の推定と測定

細胞の状態に結果は左右されるので，細胞懸濁液を調製したら素早く測定を開始する．1サンプルにつき，測定は2回行う．3回目の測定の頃には細胞の状態が悪くなっていることがある（最大光合成速度 Vmax が低下する）ので，手際よく測定を進めることが重要である．ガスクロと酸素電極の両方を使うので，混乱しないよう準備する．

**4.b.4.7.1** マイクロシリンジ洗浄用として，100 mL または 200 mL のフラスコに，適当量の超純水を入れておく．また，10 μL のマイクロシリンジは一方を細胞採取用，他方を $NaHCO_3$ 溶液用と決めておく．

**4.b.4.7.2 初期 DIC の測定**

1）酸素電極の測定チャンバーに調製した細胞懸濁液を 1.5 mL 入れ，350 μmol photons m$^{-2}$ s$^{-1}$ の光を照射し，$N_2$ ガスを5分〜15分程度通気する（図 10 A）．

＊通気が短すぎると溶存 Ci が十分に消費されない一方で，長すぎると細胞の状態が悪化するので注意．比較するサンプル間では，通気時間の長さを同じにする．

2）$N_2$ ガスのチューブを測定チャンバーから抜き，素早く蓋をする．

3）酸素電極のレコーダーの測定レンジを 2 V に設定し，レコーダーペンを下ろしてチャートをスタートさせる．チャートスピードは 1,200 mm/hr のままで，レコーダーペンはレコーダーやコントロールボックス（Back-ff の coarse, fine）で調節して，測定値の低い側（チャート用紙の端の方）に寄せておく．

4）ガスクロのレコーダーの〝START〟を押し，チャートをスタートさせる．

5）測定チャンバーからマイクロシリンジを使って細胞を 10 μL 取り出し＊，ガスクロのガラスセルにアプライする＊＊．細胞を採取したタイミングを，酸素電極のチャートに印をつけておく．

＊EZA（Ethoxyzolamide）等の阻害剤を加える場合は，細胞を採った後にマイクロシリンジを使って添加する．阻害剤を含んだ細胞懸濁液をガスクロにアプライすると，正確な測定ができないので注意する．

＊＊細胞懸濁液がガラスセルの中で垂直に落ちたことを確認すること．横に飛び散った場合は，正確に測定できていないのでやり直す．

6）ガスクロのチャートにピークが確認できたらレコーダーペンがベースラインに戻るまで待ってから〝STOP〟を押してチャートを止め，AREA の面積を算出させる．これを初期 DIC とする．

**4.b.4.7.3 光合成活性の測定**

酸素電極のレコーダーのチャートは止めずに，前項の DIC 濃度の測定から続けて行う．

1）励起光を 750 μmol photons m$^{-2}$ s$^{-1}$ にする．

2）表2に従って，$NaHCO_3$ 溶液をマイクロシリンジで低濃度のものから順に 30 秒間毎に加えていく（図 10 B）．$NaHCO_3$ 溶液を加えたタイミングをマークして，$NaHCO_3$ の終濃度も書き込んでおく（図 10 C）．

＊ 30 秒のタイミングを逃してしまった場合でも，溶液

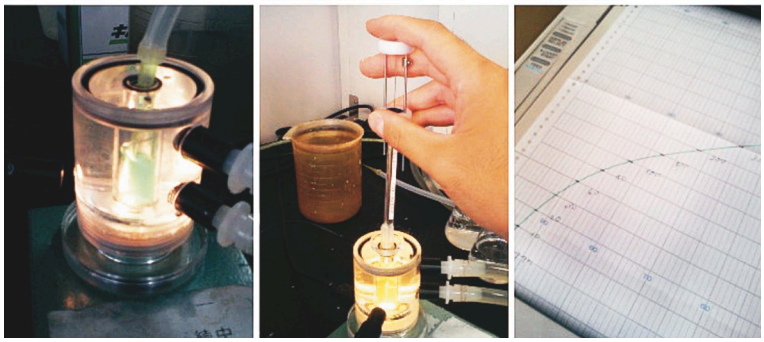



**図 10**：無機炭素（Ci）の枯渇と酸素発生速度の測定．A．細胞に N 2 ガスを通気し，Ci を枯渇させている様子．ガス圧が高すぎると細胞懸濁液が飛散し液量が減るが，低すぎると細胞が Ci を消費し切るまで時間を要するので，程良いガス圧に調節する．B．測定チャンバーの蓋上部の穴から，マイクロシリンジで $NaHCO_3$ 溶液を加える様子．C．活性測定時のチャートの様子．$NaHCO_3$ 溶液を加えた時点にマークを付けておく．$NaHCO_3$ 溶液を加える毎に，徐々に酸素濃度が上昇する．

表 2：活性測定時に加える各 $NaHCO_3$ 溶液の量と終濃度

| Stock 液 | 量（終濃度） | stock 液 | 量（終濃度） | stock 液 | 量（終濃度） |
|---|---|---|---|---|---|
| 15 mM | 1 μl（10 μM） | 150 mM | 1 μl（100 μM） | 750 mM | 1 μl（ 500 μM） |
| | 2 μl（20 μM） | | 1 μl（100 μM） | | 2 μl（1,000 μM） |
| | 3 μl（30 μM） | | 2 μl（200 μM） | | 4 μl（2,000 μM） |
| | 4 μl（40 μM） | | 3 μl（300 μM） | | 10 μl（5,000 μM） |
| | 5 μl（50 μM） | | 4 μl（400 μM） | | |

を加えたポイントをマークしておけば良い．要は，チャート上で何 mm 進んで何 mm 上昇したか（＝単位時間あたりどれだけ $O_2$ が発生したか）がわかれば良い．

3）最高濃度まで測定を終えたらレコーダーのチャートを止め，励起光を切る．

4）測定チャンバーから細胞を除き，$NaHCO_3$ が残らないように超純水で 10 回以上洗う．また，$NaHCO_3$ に使ったマイクロシリンジも，洗浄用の超純水で 20 回以上洗う．$NaHCO_3$ が残っていると，次の測定が正確に行えないので注意する．

5）ガスクロのレコーダーの〝START〟を押してチャートをスタートさせ，マイクロシリンジで 0 μM DIC 用の（調製直後の）超純水を 10 μL 計り取り，ガスクロにアプライして DIC 量を測定する．アプライした液体は超純水なので，シリンジが十分洗ってあれば Calibration standard 測定時のものと同程度の高さのピークが検出される．明らかに大きなピークが検出された場合は，シリンジ内に $NaHCO_3$ が残っているということなので，更に数回超純水で洗って再度測定する．

#### 4.b.4.8 あと片付け

##### 4.b.4.8.1 酸素電極

1）レコーダー，Back-Off 装置，循環型恒温槽の電源をそれぞれ切る（特に順番はない）．

2）測定チャンバーは数回超純水で洗い，最後に飽和 KCl を 1 mL 程度入れてフタをする．液面がフタの下側に付かないようにする．

##### 4.b.4.8.2 ガスクロマトグラフ

1）ガラスセル横のツマミを CHARGE に合わせ，下のバルブを開く．

2）ガラスセル上部のフタを外してチューブをつなぎ，アスピレーターをつないで吸引する．

3）ガラスセル下部から超純水を吸引させて，カラム内を洗う．

4）ガラスセル下部にアスピレーターをつないで，上部から超純水を吸引してカラム内を洗う．

5）洗浄が終わったらメタナイザーのカタリシスを 300°Cに合わせて，水素，空気ボンベの元栓のみ閉じる．

6）窒素ガスは，PRIMARY を 100 に合わせて一晩放置する．

7）翌日も測定を行う場合は，この状態から 4.b.4.1 ガスクロ本体の準備の手順(2)以降の準備を行うことができる．測定を行わない場合は，翌日には窒素ガスの元栓を閉じて，メタナイザー，ガスクロ本体の電源を切る．

##### 4.b.4.8.3 マイクロシリンジ

1）使用したマイクロシリンジは，全て超純水を十数回通す．特に $NaHCO_3$ 用のシリンジは十分洗浄しておくこと．

2）ピストンを外して，タオルペーパー等の上で一日乾燥させる．

3）乾いたらピストンをシリンジに戻し，それぞれの箱に戻す．濡れた状態でピストンを戻さないこと（内側に張り付いて抜けなくなる）．

#### 4.b.4.9 データ解析

測定結果の解析は，1）各測定点における酸素発生活性の計算，2）各測定点における実際の DIC 濃度の計算，3）グラフ化の 3 ステップから成る．1），2）では，Excel に計算式を入力しておくと作業の効率が上がる．この時必要な情報は，以下の通り．

1）光合成活性を測定した細胞のクロロフィル濃度

2）Air-$N_2$ の高さ（単位は mm）→ 4.b.4.5 を参照

3）ガスクロで測った初期 DIC 濃度（μM）→ 4.b.4.7.2 を参照

##### 4.b.4.9.1 各 DIC 濃度における酸素発生活性の計算

まず，$NaHCO_3$ 溶液を加えたある点から次の点までで，チャートがどのくらい進んだ時に酸素発生量がどの程度上昇したのかを計算する．

1）測定した全ての点について，次の a，b（図 11 の a，b に相当）をチャート紙に直接定規を当てて測る（1 mm の 10 分の 1 まで読み取る）．

ａ）2 点間のチャートの進み具合

ｂ）2 点間での酸素発生量の上昇

ガスクロ測定用の細胞を採取した点から一番最初の $NaHCO_3$ 溶液を加えた点（すなわち終濃度 10 μM の点）についても同様に，上記 a，b を測る．

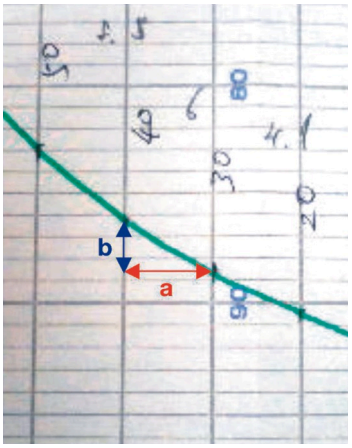



図 11：酸素発生測定後の解析．チャートの進んだ距離（a）と測定点における酸素発生量（b）を，それぞれ定規で測る．図の a.b の場合は，30 μM の測定点での酸素発生活性を算出することになる．

2）各点における酸素発生活性（μmol $O_2$ mgChl$^{-1}$ h$^{-1}$）を算出する．5 mM 点の活性を最大光合成活性（Vmax）とし，野生株であれば通常 110－190 μmol $O_2$ mgChl$^{-1}$ h$^{-1}$ 程度の活性が得られる．

#### 4.b.4.9.2　各測定点における実際の DIC 濃度の計算

測定実験では細胞懸濁液に $NaHCO_3$ 溶液を順次加えているが，実際の DIC 濃度は純粋な積算になるのではなく，各点で光合成によって低下しているはずである．4.b.4.7.3 で得られた酸素発生活性を基にして，各点における実際の DIC 濃度を求める．これを無視すると，最も重要な $K_{1/2}$ 値を数十 μM 高く見積もってしまうことになる．

1）光合成の一般式（$6\,CO_2 + 6\,H_2O \rightarrow C_6H_{12}O_6 + 6\,O_2$）に基づくと，消費される DIC 量と発生する $O_2$ 量は理論上 1 対 1 の関係にある．各測定点での酸素発生量（図 11，b）から，それぞれの測定点間において消費された DIC 量を算出する（単位は μM で）．

2）初期 DIC 濃度測定点－10 μM 点間での DIC 消費量を初期 DIC 濃度から引き，この数値に 10 μM を加える．これを 10 μM 点での〝実際の DIC 濃度〞とする．

3）10 μM 点－20 μM 点間での DIC 消費量を 10 μM 点での実際の DIC 濃度から引き，この数値に 20 μM を加えて 20 μM 点での〝実際の DIC 濃度〞とする．

4）同様の操作を 5 mM 点まで行う．

＊ Excel を使ってテンプレートを作成しておくと，解析が簡略化できる．著者らはクロロフィル濃度，Air-line から $N_2$-line までの高さ，初期 DIC 濃度，チャートの a,b の数値をそれぞれ入力すれば，各点での酸素発生活性，および実際の DIC 濃度が算出できるようなテンプレートを作成している（図 12）．

#### 4.b.4.9.3　グラフ化による $K_{1/2}$ 値の決定

上記の作業が完了した時点で，ある程度 $K_{1/2}$ は見当がつくが（活性が Vmax の 50％になる実際の DIC 付近），その濃度付近の測定が正確に行えていない場合がある．$K_{1/2}$ は，グラフ化して測定全体を見た上で決定した方が，妥当な値が得られる．

1）横軸の〝実際の DIC（μM）〞，縦軸に酸素発生活性の絶対値（μmol $O_2$ mgChl$^{-1}$ hr$^{-1}$）または Vmax を 100％とした時の相対値をとって，Excel または適当なグラフソフトを使ってグラフを描く．

2）近似曲線を描き，最大活性（Vmax）の 50％を与える

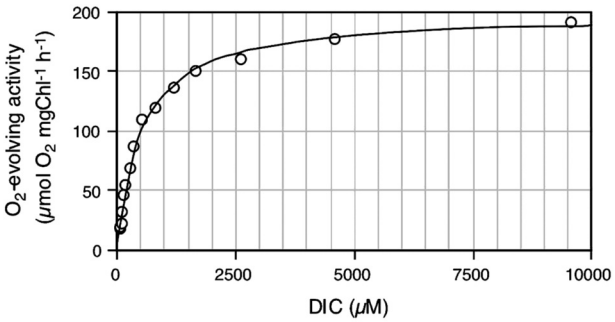



図 13：縦軸に酸素発生活性の絶対値をプロットした場合の例．

Template for O2 evolution

| | A | B | C | D | E | F | G | H |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 4 | Chlorophyll (μg/ml) | 18.2 | | | | | | |
| 5 | air-N2 (mm) | 204 | | | | | | |
| 6 | Initial DIC.(μM) | 73.9 | | | | | | |
| 7 | | | | | | | | |
| 8 | NaHCO3 supply | chart (mm) | O2 ↑ (mm) | Gradient X | μmolO2/mg Chl/hr | DIC consumption(μM) | actual DIC(μM) | O2 ↑ (%) at 10 mM |
| 9 | 0 | 20.0 | 6.50 | 0.33 | 17.7 | | 73.9 | 9.3 |
| 10 | 10 | 10.0 | 3.6 | 0.36 | 19.6 | 8.1 | 75.8 | 10.3 |
| 11 | 20 | 10.0 | 4.1 | 0.41 | 22.4 | 4.5 | 91.4 | 11.7 |
| 12 | 30 | 10.0 | 6.0 | 0.60 | 32.7 | 5.1 | 116.3 | 17.1 |
| 13 | 40 | 10.0 | 8.5 | 0.85 | 46.4 | 7.4 | 148.8 | 24.3 |
| 14 | 50 | 10.0 | 10.0 | 1.00 | 54.6 | 10.6 | 188.3 | 28.6 |
| 15 | 100 | 10.0 | 12.5 | 1.25 | 68.2 | 12.4 | 275.9 | 35.7 |
| 16 | 100 | 10.0 | 16.0 | 1.60 | 87.3 | 15.5 | 360.3 | 45.7 |
| 17 | 200 | 10.0 | 20.0 | 2.00 | 109.1 | 19.9 | 540.5 | 57.1 |
| 18 | 300 | 10.0 | 22.0 | 2.20 | 120.0 | 24.8 | 815.6 | 62.9 |
| 19 | 400 | 12.0 | 30.0 | 2.50 | 136.4 | 27.3 | 1188.3 | 71.4 |
| 20 | 500 | 8.0 | 22.0 | 2.75 | 150.1 | 37.2 | 1651.1 | 78.6 |
| 21 | 1000 | 10.0 | 29.5 | 2.95 | 161.0 | 27.3 | 2623.8 | 84.3 |
| 22 | 2000 | 10.0 | 32.5 | 3.25 | 177.3 | 36.6 | 4587.2 | 92.9 |
| 23 | 5000 | 10.0 | 35.0 | 3.50 | 191.0 | 40.3 | 9546.8 | 100.0 |
| 24 | | | | | | | | |

図 12：測定結果を計算する際に用いる Excel の template の例．

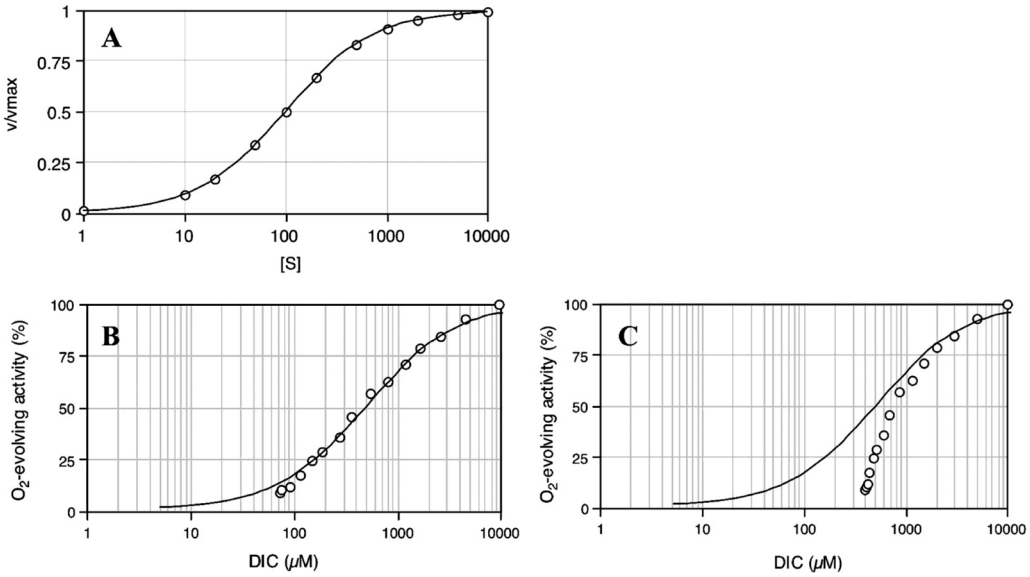



**図 14**：Michaelis-Menten 式と理論曲線を利用した，測定結果の評価の例．A．Michaelis-Menten 式に従って描いた酵素反応曲線．B．理論曲線と実際の測定点を重ねた例．測定が正確であれば，ほとんどの点は理論曲線に載る．C．初期 DIC 濃度を実際よりも高濃度に推定し間違えた場合の理論曲線と実測値の関係．

DIC 濃度を $K_{1/2}$ としてグラフから読み取る（図 13）．

#### 4.b.4.9.4　測定精度の評価

DIC 濃度と光合成活性はおおよそ一次酵素反応的な関係にあるので，Michaelis-Menten の式を利用すれば，実験の精度が評価できる．

1）Michaelis-Menten の 式（v/Vmax＝[S]/(Km＋[S])）に従って，任意の数値を入力して酵素反応の理論曲線を描く．この時，縦軸の v/Vmax は 0 － 1 の範囲に linear で，横軸の基質濃度 [S] は 1 －10000 の範囲に log でそれぞれプロットする（図 14 A）．

2）4.b.4.9.3 で縦軸に相対値をとって描いたグラフについて，横軸を 1 －10000 の範囲に log でプロットし直し，1）の理論曲線と同じサイズのグラフ枠で描く．

3）1）の理論曲線を 2）の実測データによる曲線と重ね合わせて，左右いずれかに移動させた時，2）の各点が大方載ってくれば測定は成功と判断できる（図 14 B）．大きくずれる場合は，何か実験操作に問題があったか（例えば，初期 DIC 濃度の測定を失敗した）か，新しい発見である．いずれにしても，測定を複数回行い，再現性を確認する．

＊ある点だけ理論曲線からずれる場合は，理論曲線に載ってくる他の点を主に考慮して $K_{1/2}$ を求める．シグモイド型にはなっても傾きが理論曲線とは一致しない場合は，プロットした点を測定した際に，本来の濃度よりも全体的に高濃度（図 14 C）または低濃度側にシフトしている場合がある．この場合は，初期 DIC の測定ミスが原因である可能性が高い．

## 謝辞

本法の確立には，関西学院大学理工学部・松田祐介先生に多大なご協力を得た．ここに記して感謝申し上げる．

## 参考文献

1）T. Yamano & H. Fukuzawa, J. Basic Microbiol. 49 (2009) p.42

2）M. R. Badger & M. H. Spalding, Photosynthesis: Physiology and Metabolism, ed. R. C. Leegood, T. D. Sharkey & S. von Caemmerer, The Netherlands, Kluwer Academic Publisher, 2000, p.369

3）J. A. Raven, Eur. J. Phycol 32 (1997) p.319

4）T. Omata, G. D. Price, M. R. Badger, M. Okamura, S. Gohta & T. Ogawa, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96 (1999) p.13571

5）S. C. Burey, V. Poroyko, Z. N. Ergen, S. Fathi-Nejad, C. Schuller, N. Ohnishi, H. Fukuzawa, H. J. Bohnert & W. Löfelhardt, Plant Cell Environ. 30 (2007) p.1422

6）B. C. Birmingham & B. Colman, Plant Physiol. 64 (1979) p.892

7）Y. Matsuda & B. Colman, Plant Physiol 110 (1996) p.1283

8）福澤秀哉，「タンパク質化学第 4 巻：酵素 4.4 リアーゼ（II）」，廣川書店，2003，p.177

# 5．葉緑体の光合成活性測定
## ―― 単離葉緑体を用いた炭酸固定測定 ――

真野　純一[1)]

単離葉緑体での炭酸固定測定によって，カルビン回路成分の機能的統合性に関する生化学的解析ができる．酸素電極を用いた炭酸固定測定法と，光合成部分活性測定法を紹介する．

## $CO_2$-fixation in isolated chloroplasts

Jun'ichi Mano

Intact chloroplasts that have high activity of $CO_2$ fixation are useful for investigating the integrity of the Calvin cycle components and the electron transport chain.　Although obtaining highly active chloroplasts is sometimes difficult, the supplementation with glyceraldehyde-3-phosphate will result in a satisfying level of activity, which represents the whole pathway from $H_2O$ to $CO_2$.

### 5.1　はじめに

炭酸固定活性の高い葉緑体が単離できる高等植物はホウレンソウ，エンドウマメなどに限られており，分子生物学の対象となるシロイヌナズナやタバコ，イネではまだ難しい．カルビン回路の integrity に関する生化学的解析には，単離葉緑体での炭酸固定測定が必要である．ここでは酸素電極を用いた炭酸固定測定法と，光合成部分活性測定法を紹介する．

### 5.2　炭酸固定活性の高い葉緑体の調製

葉緑体として炭酸固定研究に使える活性レベルは，$CO_2$ を電子受容体としたときの $O_2$ 発生が 50 $\mu$mol mg $Chl^{-1}h^{-1}$ 程度以上であり，100 $\mu$mol mg $Chl^{-1}h^{-1}$ が得られれば，かなりよい．葉緑体の単離法の詳細は(3)2 a を参照していただきたいが，筆者の経験では活性の高い葉緑体を得るコツは次の通りである．(1)植物材料の鮮度．ホウレンソウも研究室（圃場）で栽培し，調製日の早朝に収穫する（天気のよい日は，日照にともない葉緑体にデンプン粒が蓄積し，インタクト率の高い葉緑体調製が難しくなる）．(2)葉を破砕する際，できるだけ低い温度で行う．筆者の研究室では調製開始の 1 時間くらい前に破砕用メディウムを冷凍庫で冷却し（フレーク状の氷が少しできる程度），使用している．(3)葉の破砕からパーコール密度勾配遠心分離までをできるだけすばやく行う．このような注意を払っても，$CO_2$ を与えるだけで活発に $O_2$ 発生を行う葉緑体を得るのは難しい．これは，カルビン回路中間体の糖リン酸が葉緑体から失われてしまうことが主な原因と考えられる．筆者らはカルビン回路の全過程を含む光合成活性を測定するために糖リン酸中間体を補っている．

### 5.3　グリセルアルデヒド-3-リン酸（GAP）補塡による $CO_2$ 固定測定

カルビン回路の中間体となる糖リン酸は葉緑体包膜のトランスポーターを介してストロマに入るため，外部から補塡することができる[1)]．外部から葉緑体に供給された GAP は，光照射下で ATP を消費し RuBP に変換され，Rubisco 反応が進行すると PGA となる．PGA から GAP への還元に，ATP と電子伝達系から供給される NADPH が消費され，これに伴い $O_2$ が発生する（図 1 ①）．$CO_2$ の代わりに PGA のみを電子受容体として葉緑体に与え，PGA 依存性の $O_2$ 発生を観測することもでき

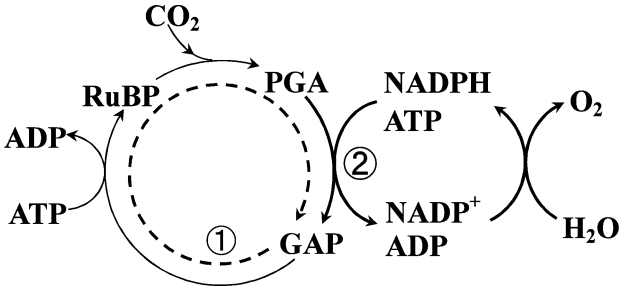



図 1：GAP 補塡による炭酸固定活性（①）と PGA 還元活性（②）．GAP 依存 $O_2$ 発生（電子伝達）にはカルビン回路の全過程が関与する．

1）山口大学総合科学実験センターアイソトープ分析施設

る(②)．①の GAP 依存的 $O_2$ 発生活性は電子伝達系とカルビン回路の全過程を含んでおり，反応に関わる成分が多いため，葉緑体調製後も活性は失われやすい．②は部分反応であり，PGA を GAP に変換する酵素（ホスホグリセリン酸キナーゼとグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ），電子伝達系からの NADPH 供給，光リン酸化による ATP 供給が揃えば観測される．包膜が破れストロマ成分が拡散してしまうと②の活性も失われてしまうので，部分反応といえども葉緑体の機能的統合性のひとつの指標となる．たとえば学生実験レベルでは，PGA 還元活性が脱共役剤により完全に阻害されることから電子伝達系とストロマ酵素系との共役について考察させることができる．

**[実験方法]**

1．用意する試薬など

(1) 葉緑体懸濁メディウム（X 2）

| | |
|---|---|
| ソルビトール | 0.6 M |
| $MgCl_2$ | 2 mM |
| NaCl | 20 mM |
| DTPA（※） | 1 mM |
| アスコルビン酸（用時添加） | 2 mM |
| ピロリン酸ナトリウム | 1 mM |
| Hepes-NaOH | 100 mM，pH 7.6 |

※ diethylenetriamine *N, N, N′, N″, N‴*-pentaacetic acid

(2) GAP 溶液　50 mM

(3) $NaHCO_3$ 溶液　200 mM

(4) PGA 溶液　200 mM

(5) ホウレンソウ葉緑体

単離後，パーコール密度勾配遠心分離により精製し，葉緑体懸濁メディウム（X1）に懸濁した（～2 mgChl $ml^{-1}$）標品．インタクト率 90%以上が望ましい．

2．GAP 依存性 $O_2$ 発生活性測定

(1) 酸素電極のセルに下の溶液を加え，蒸留水で全量を 990 $\mu$l とする．

| | |
|---|---|
| 葉緑体メディウム（X2） | 500 $\mu$l |
| $NaHCO_3$ 200 mM | 50 $\mu$l |
| GAP 50 mM | 10 $\mu$l |

(2) 葉緑体を 15 $\mu$gChl $ml^{-1}$ となるよう加え，ふたをして暗所で撹拌しながら酸素濃度変化を 2 ～ 3 分間記録する．

(3) 光照射し，酸素発生を記録する．光照射時の最大 $O_2$ 発生速度と光照射前の $O_2$ 濃度変化速度の差を活性とする．

3．PGA 光還元活性

(1) 酸素電極のセルに下の溶液を加え，蒸留水で全量を 990 $\mu$l とする．

| | |
|---|---|
| 葉緑体メディウム（X2） | 500 $\mu$l |
| PGA 200 mM | 10 $\mu$l |

(2)，(3)は上記 2．と同じ．

## 参考文献

1）D. Walker, Use of the Oxygen Electrode, Sheffield, Oxygraphics Ltd., 1987.

# 3章

# 単離・精製・活性測定

# 1．代謝産物量の定量
## a．CE/MS を用いた陰イオン性代謝産物の定量

原田　和生[1)]，福崎英一郎[2)]

光合成によって固定化された炭素フラックスを議論する上で，糖リン酸，有機酸，糖ヌクレオチドなどの陰イオン性代謝産物を定量する方法は非常に重要である．当該陰イオン性代謝産物を分離，同定，定量する方法としてイオンクロマトグラフィーやイオンペアークロマトグラフィーなどの方法が提唱されてきたが，これらの手法にはいくつか問題があった．本章ではキャピラリー電気泳動／質量分析法（CE/MS）法を用いた陰イオン性代謝産物測定法について紹介する．

## Metabolic profiling of anionic compounds by capillary electrophoresis / mass spectrometry

Kazuo Harada, Eiichiro Fukusaki

Metabolic profiling of anionic compounds, such as sugar phosphates, organic acids and nucleotides, provides us the knowledge of photosynthetic carbon-fixing metabolism.　Capillary electrophoresis / mass spectrometry (CE/MS) is very useful method for metabolic profiling of anionic compounds.

### 1.a.1　はじめに

光合成によって固定化された炭素のフラックスを議論する上で，カルビン・ベンソン回路，光呼吸，解糖系，トリカルボン酸回路（TCA 回路）等の代謝情報は必要不可欠である．当該代謝経路の中間体は全て糖リン酸，糖ヌクレオチド，有機酸，コエンザイムA誘導体(CoA 体)のいずれかの化合物である．さらに ATP，GTP，NAD，NADP，FMN などのヌクレオチド類が補酵素として数多くの代謝反応に関わっている．したがって，光合成暗反応の代謝変動を議論するためには糖リン酸，有機酸，ヌクレオチド，CoA 体を測定する代謝産物プロファイリング手法が必須である．糖リン酸，有機酸，ヌクレオチド，CoA 体を含む化合物群は酸性極性基であるカルボキシル基，あるいはリン酸基を有する．そこで，本稿においては当該化合物群を陰イオン性代謝産物と標記する．

近年，ガスクロマトグラフィー/質量分析(GC/MS)[1)]，液体クロマトグラフィー/質量分析（LC/MS)[2)] などの代謝産物プロファイリング手法が発達し，一度に数十～数百もの低分子代謝産物を一斉に検出，定量することが可能となってきた．しかし，GC/MS や汎用されているオクタデシルシリル（ODS）カラムを用いた LC/MS では陰イオン性代謝産物を分離，検出することが極めて困難である．陰イオン性代謝産物に特化した分析手法としては，LC/MS 法の一種であるアニオンイオン交換クロマトグラフィー/質量分析（anion exchange ion chromatography/mass spectrometry, AEC/MS)[3),4)] やイオンペアー液体クロマトグラフィー/質量分析（ion-pair　liquid chromatography/mass spectrometry, IP-LC/MS)[5)] が挙げられる．AEC は溶離液に高濃度の不揮発性塩を使用するが，これがエレクトロスプレーイオン化（electrospray ionization, ESI）室に流入すると，塩が析出し，イオン化が阻害される．したがって，質量分析計に導入される前に溶離液中の塩を取り除くためにクロマトグラフ装置と質量分析計の間にイオンサプレッサーを設置することが必須であるが，塩を完全に取り除くことは極めて困難である．IP-LC/MS は揮発性の塩をイオンペアー試薬として用いるが，MS でのイオン化の際にイオンペアー試薬が陰イオン性化合物とイオンペアーを形成し，結果，分析対象化合物のイオン化効率が変動し，再現性に劣ることが問題となる．

### 1.a.2　CE/MS の原理

前項で述べた方法の他にイオン性化合物を分析する強力な手法としてキャピラリー電気泳動/質量分析（capillary electrophoresis/mass spectrometry, CE/MS)[6),7),8),9),10)] が挙げられる．図 1 に CE/MS システムの模式図を示した．

CE は内径 50～100 $\mu$m 程度のキャピラリーの中を電解質で満たし両端に数十 kV の電圧を印加することによ

1）大阪大学大学院薬学研究科
2）大阪大学大学院工学研究科

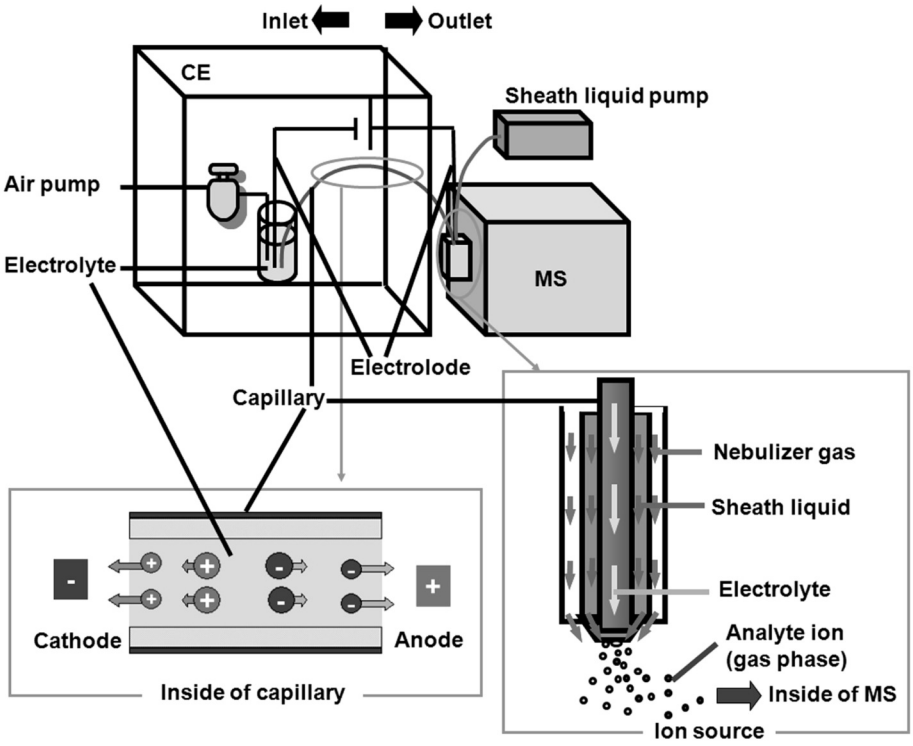



図1：CE/MS システムの模式図

り，対象化合物を電荷と分子の大きさの違いにより分離する．異性体も電荷分布と分子の大きさが異なるのでCE により分離が可能である．また，内径が非常に小さいキャピラリーを使用するため，分析対象化合物の熱拡散を抑制でき，高い分離能を達成することが可能となる．

キャピラリー出口は質量分析計に接続されており，ESI 法により対象化合物の気相イオンが形成される．通常，メタノール等の極性有機溶媒と酢酸アンモニウム等のイオン化補助剤を含むシース液（sheath liquid）をイオン化室内で電解質と混合する手法が用いられる．これは，ESI イオン化室に流入する液体が電解質のみの場合では気相イオンが形成される際に必要な脱溶媒の効率が非常に低く，脱溶媒および気相イオン化を促進する必要があるためである．気相試料イオンは質量分析装置内の質量分離部に導入され，質量電荷比（$m/z$）の値に従って分離，検出される．ESI 法ではプロトン化分子や脱プロトン化分子などのような分子内結合が開裂していない分子量関連イオンが検出されるので，化合物の同定に有用である．

このようにCE はイオン性化合物に対して高い分離能を，MS は高い選択性と感度を有するので，CE/MS 法はイオン性化合物を誘導体化することなく精度良く測定することが可能である．したがって，当該手法は陰イオン性代謝産物をプロファイリングする非常に強力な手法となる．

## 1.a.3　CE/MS 測定手法

CE/MS の大まかな測定条件について以下に記述する．具体的な操作手法はどのメーカーの機種においてもほぼ同様であるが，細かい部分で若干異なる点が多数存在する．実際に運用する際は各メーカーの説明を参照して頂きたい．

### 1.a.3.1　CE 条件

CE 分析条件を決定するためには，まず電気浸透流（electroosmotic flow, EOF）が質量分析計側に向かうように，用いるキャピラリーの種類と CE の極性（キャピラリー入口側を陽極とするか，陰極とするか）を決定することが必要である．EOF の発生原理は次の通りである．キャピラリー内壁表面が帯電していると電解質中に存在するカウンターイオンがキャピラリー内壁との界面に集まり電気二重層が形成される．この状態でキャピラリー両端に電圧が印加されると，電解質の流れが発生する．これが EOF である．EOF の方向はキャピラリー内壁の電荷によって決まり，正電荷の場合は陰極から陽極，負電荷の場合は陽極から陰極となる．また EOF の大きさはキャピラリー内壁表面の電荷密度が高ければ大きくなり，低いと小さくなる．電荷が無ければ 0 となる．この

EOF が質量分析計の方向に向かなければ，質量分析計側のキャピラリー内部に空気の層が生じ，電気泳動が成立しない．

陰イオン性代謝産物プロファイリングに用いられるキャピラリーは（i）未修飾フューズドシリカキャピラリー[9]（内壁にシラノール基が露出），(ii)化学修飾によりスルホン基が内壁表面に提示されたキャピラリー（例，GL sciences 社製 FunCap Type S）[10),11)]，（iii）カチオン性ポリマーで物理的にコーティングされたキャピラリー（例，Nacalai Tesque 社製 SMILE(+)）[6),12)]，（iv）ポリジメチルシロキサンによりコーティングされたキャピラリー（例，Agilent Technologies 社製 DB-1）[7)] の 4 種である．上述の EOF の発生原理に基づくと (i)，(ii) を用いる場合，CE の極性はキャピラリー入口を陽極，出口を陰極とし，(iii) を用いる場合は入口を陰極，出口を陽極とする．また，(iv) の場合は通常（iii）と同じ極性を用いるが，ほぼ完全に EOF が抑制されるため，CE 付属のエアーポンプを用いて電解質バイアルを加圧することにより，電解質の流れを発生させる必要がある．尚，(i)，(ii) を用いた場合は陰イオン性化合物が静電引力により陽極である入口側に引き寄せられるため，それ以上の大きさの電解質の流れを発生させる必要がある．EOF の大きさがそれに達しない場合は (iv) と同様にエアーポンプによる送液を用いる必要がある．また，同じく (i)，(ii) を用いた場合，分離の途中からエアーポンプで送液を行い，キャピラリー中に残った化合物を質量分析計側に送り込む手法も非常に有用である[9]．ただし，電解質の流れの速度分布が，EOF は均一な栓流に近いのに対し，エアーポンプによる送液は放物面を持つ層流となるため，分離度が低くなるというデメリットもある．

キャピラリーの使い分けに明確な指針はないが，(iii) は ATP や GTP などの多価イオンが内壁に吸着されやすい[6]，(iv) は電解質の pH を 7 以上にすることができない，といった問題点がある．また，(ii)～(iv) は (i) に比べ約 10 倍もの価格になることも考慮しなければならない．なぜなら，キャピラリーは GC や LC のカラムに比べ圧倒的に寿命が短く，ランニングコストを無視することができない．CE におけるキャピラリーの寿命とは両端に電圧を印加しても電流が流れなくなり，電気泳動が成立しなくなる状態の事を指している．この点を鑑みると (i) は他の 3 者に比べ，移動時間の再現性や寿命の点でやや劣るが，ランニングコストが抑えられることから，ファーストチョイスとして適していると著者らは考える．

続いて電解質の pH と組成について言及する．これらは化合物の分離と EOF の大きさに影響を及ぼす．pH が 8 以上でないとリボース 5-リン酸やリブロース 5-リン酸のような構造異性体の分離は難しい．しかし，pH を上げ過ぎると，キャピラリー内壁の修飾基あるいはシリカに含まれるシロキサン結合が開裂しやすくなり，キャピラリーの寿命が短くなる．通常は pH 8～9 程度に調整する．また，電解質は質量分析計においてイオン化を阻害しないよう揮発性のものを使用しなければならない．従って CE/MS において利用できる電解質は非常に制限され，酸として蟻酸，酢酸，塩基としてアンモニウム，トリメチルアミン，トリエチルアミンが用いられる．濃度は 50 mM 程度が適している．これ以上高くするとキャピラリーに過電流が流れ，安定しにくくなる．これらの電解質の種類は EOF や分離にも影響を与える．著者らの経験では，酢酸やトリエチルアミンを用いると EOF は小さくなり，分析時間が長くなるが異性体の分離が向上しやすくなり，蟻酸やアンモニウムを用いると EOF が大きくなり，分析時間が短縮されるが，異性体の分離がやや劣るという傾向が見られた．

次に重要なのは試料注入量である．注入量が大きいと当然感度が上昇するが，エレクトロフェログラムのピーク幅が広くなり，分離が難しくなる．通常は 10 nl 程度にするのがよいと思われる．試料注入はエアーポンプを用いて試料バイアルに非常に低い圧力で加圧することにより行う．

### 1.a.3.2 MS 条件

第 2 項で述べたように CE キャピラリーの出口側は MS の ESI イオン化室に接続される．CE/MS の成否のカギを握るのはこの接続部分といっても過言ではない．通常，スプレーニードルの構造は図 1 に示すように，二重構造となっている．すなわち内側の SUS ニードル中を CE キャピラリーが通り，キャピラリーとニードルの間をシース液，内側と外側の SUS ニードルの間をネブライザーガスが通過し，先端部で電解質，シース液，ネブライザーガスが混合され，イオン化室内部に噴霧される仕組みになっている．MS の機種によって CE キャピラリーが内側の SUS ニードルの先端から突出する場合と，内側の SUS ニードルの先端がテーパー状になり，CE キャピラリー先端はニードルの中に収まっている場合の二種類が存在する．前者の場合，二つの SUS ニードルと CE キャピラリーの先端の位置のバランスがスプレーの安定性，感度に大きく影響を与える．後者の場合も二つの SUS ニードルの先端の位置バランスが重要であるが，CE キャピラリー先端は内側のニードルの先端直前まで押し込めばよく，この点に関して後者のほうが，操

作がやや簡便であるかもしれない．

さらにESIの構造の違いとして，スプレーニードルに電圧が印加される構造か，接地されているか，という点が挙げられる．前者の場合は，分析開始時CEの電圧を印加する最中にスプレーニードルに電圧を印加せず，CEの電流値が安定した後にニードルに電圧を印加し，イオンの検出を行うという工夫が必要である．

ネブライザーガス圧もスプレー形状を安定化させるのに非常に重要である．特に，ガス圧を高く上げ過ぎるとアスピレーション作用が働き，イオンの移動度が大きくなり，十分に分離される前に質量分析計に到達することになるので注意が必要である．

シース液の組成，流量は感度に直接影響を及ぼす．シース液の組成は前述のように極性有機溶媒にイオン化補助剤を添加する．有機溶媒にはメタノール，2-プロパノール，アセトニトリルが良く用いられる．陰イオン性化合物の場合は非プロトン性のアセトニトリルを50%程度の割合で用いるのが適していると思われる．イオン化補助剤には5 mM程度の蟻酸アンモニウム，酢酸アンモニウムが用いられる．流速は低いほうが分析対象化合物の希釈も抑えられ，検出感度が高まるが，CEの電流値が安定しない，ピーク面積がばらつきやすい等，システムが安定化しにくい場合がある．シース液の流速を上げると，感度は落ちるが，安定化しやすい．機種によって最適な値を探索すべきであるが，著者らは10 μl/minが目安と考えている．

現在，質量分離部の構造が異なる様々な質量分析計が市販されているが，カルビン・ベンソン回路，解糖系，TCA回路の既知の中間体を感度良く定量するためには，タンデム四重極型質量分析計が有用である[10]．当該装置はmultiple reaction monitoring（MRM）法と呼ばれる手法によりバックグラウンドを除去し，高感度分析を達成することができる．ただし，MRM法は標準物質溶液を用いてcollision energyなど質量分析に必要な各種パラメータを最適化する必要があり従って，標準物質が入手可能な化合物でなければ分析対象にすることが難しい．また，未知化合物のスクリーニングにはあまり適していない．

飛行時間型質量分析計（TOF-MS）は精密質量情報が得られる為，未知化合物のスクリーニングに有用である[13]．また，従来はダイナミックレンジが狭く定量には不向きとされていたが，近年では計算処理により，四重極型質量分析計と同等のダイナミックレンジが達成できるようになってきた．さらにスキャン速度が四重極型に比べ圧倒的に早く，同時に多くの化合物を定量する場合は，TOF型のほうが適している．

参考までに，著者らが植物の葉に含まれるカルビン・ベンソン回路，中間体を測定する際に用いている分析条件の例を表1に記す．

**表1**：CE/MS陰イオン性代謝産物測定条件の例

| | CE |
|---|---|
| 装置 | P/ACE MDQ（Beckman Coulter） |
| キャピラリー | FunCap-CE type S（GL sciences） |
| キャピラリーサイズ | 50 mm i.d.×80 cm |
| キャピラリー温度 | 20°C |
| 試料室温度 | 4°C |
| 電解質 | 50 mM 酢酸アンモニウム pH 9.0 |
| 印加電圧 | 0-12分：30 kV，12-16分：0 kV |
| ランプ時間 | 0.30分 |
| エアーポンプ圧 | 0-12分：0 psi，12-16分：3.5 psi |
| 極性 | 陽極：入口（vial側），陰極：出口（MS側） |
| リンス条件 | 初めて使用するキャピラリーの場合：30 psi(2.1 bar)，60分間<br>分析間：30 psi，5分間 |
| 試料注入 | 2.0 psi（0.14 bar），5秒間，（約6 nl） |
| | **MS** |
| 装置 | 4000 QTRAP（Applied Biosystems） |
| イオン化室 | Turbo V ion source（Applied Biosystems） |
| イオン化法 | ESI |
| 極性 | ネガティブ |
| イオンスプレー電圧 | 0-1分：0 kV，1-16分：−4.5 kV |
| ネブライザーガス圧 | 20 psi |
| モニタリング法 | MRM |
| Dwell time | 100 msec/1 MRM |
| シース液 | 10.0 mM蟻酸アンモニウム/アセトニトリル（50/50） |
| シース液流量 | 10 μl/min |

## 1.a.4　サンプル調製法

本稿で分析対象とした糖リン酸，ヌクレオチド類はターンオーバーが非常に速く，サンプリング時に瞬時にクエンチングを行わなければ，代謝が進んでしまい本来の代謝プロファイルを得ることができない．特に液体培地で培養した光合成微生物や培養細胞は，培地と細胞の分離，細胞の洗浄に時間がかかり正確な代謝プロファイリングを困難にする．細胞懸濁液を－20°C程度に冷却したメタノール水溶液に直接入れて，クエンチングと洗浄を同時に行う方法も提唱されているが，菌体からのアミノ酸や有機酸の漏れが大きいことが報告されている[14]．また，サンプル抽出にはメタノールなどの極性溶媒が用いられるが，水分を大量に含むサンプルであると酵素が十分失活せず代謝が進んでしまう．そのような場合は凍結乾燥などで代謝をクエンチしながら乾燥させる等の工夫も必要である．

サンプル前処理としては，タンパク質，脂質の除去が重要である．当該化合物群はCEにおける分離を著しく阻害する．特に，光合成が盛んな植物の葉の組織においてはクロロフィルや光合成関連タンパク質が大量に含まれており，これらを徹底的に除去しなければならない．これらの除去には下記に示す通り，液々分配および限外濾過が有効である．固相抽出による精製も考えられるが，回収率の低下が回避できず，加えて汎用されているシリカベースの固相担体ではリン酸エステル結合が開裂しやすいなどの問題も生じる．

植物の葉の組織において，糖リン酸は比較的低濃度であり，場合によっては濃縮が必要である．しかしながら，必要以上に濃縮するとCEの電流値が安定しない，ピーク形状が悪くなる，分離が不十分でイオンサプレッションによりイオンがより検出し難くなるなどの不具合が生じるので注意が必要である．また，CEの分離能を十分引き出すためには，試料溶液は伝導度の低い超純水で溶解させておく必要がある．

以下に，植物組織を用いた場合のサンプル調製法を記す．

[実験方法]

1．植物組織（湿重量，約100 mg）を2.0 mlサンプルチューブに移し，液体窒素で凍結させ，ボールミルで20/秒の速度で破砕．
2．破砕した細胞に500 μlのメタノールと20 μlの内部標準物質溶液（100 μM　piperazine　1,4-bis（2-ethanesulfonic acid（PIPES））を添加し，37°C，5分，1,200 rpmの条件で振盪し，抽出．
3．500 μlのクロロホルム，180 μlの蒸留水を添加し，振盪後，遠心分離．
4．上相（水相）を回収し，新しい1.5 mlサンプルチューブに移し，さらに200 μlの蒸留水を添加し，遠心分離．
5．上相をUltrafree MC（分画分子量5 kDa，Millipore社）に移し，10,000×g，60分間遠心し，限外ろ過．
6．得られたろ液を遠心濃縮に供し，溶媒を除去．
7．蒸留水で再溶解し，CE/MS分析に供す．

## 1.a.5　おわりに

現状ではCE/MSはGC/MSやLC/MSほど普及していない．その要因として，移動時間再現性の低さ，イオン化サプレッションの影響などの課題が挙げられる．しかし，現在のところ，カルビン・ベンソン回路，解糖系，TCA回路など光合成の炭素固定に直接関与する代謝経路の中間体を網羅できるのはCE/MSのみである．今後，技術的課題の克服が進み，バイオサイエンスに大きく貢献していくものと考えられる．

## 参考文献


1）O. Fiehn, J. Kopka, P. Dormann, T. Altmann, R. N. Trethewey, & L. Willmitzer, *Nat. Biotechnol*., **18** (2000) P.1157.
2）V. V. Tolstikov, & O. Fiehn, *Anal. Chem*., **75** (2003) P. 6737.
3）J. C. van Dam, M. R. Eman, J. Frank, H. C. Lange, G. W. K. van Dedem, & S. J. Heijnen, *Analytica Chimica Acta*, **460** (2002) P.209.
4）Y. Sekiguchi, N. Mitsuhashi, T. Kokaji, H. Miyakoda, & T. Mimura, *J. Chromatogr. A*, **1085** (2005) P.131.
5）B. Luo, K. Groenke, R. Takors, C. Wandrey, & M. Oldiges, *J. Chromatogr. A*, **1147** (2007) P.153.
6）T. Soga, Y. Ueno, H. Naraoka, Y. Ohashi, M. Tomita, & T. Nishioka, *Anal. Chem*., **74** (2002), P.2233.
7）T. Soga, Y. Ueno, H. Naraoka, K. Matsuda, M. Tomita, & T. Nishioka, *Anal. Chem*., **74** (2002) P.6224.
8）T. Soga, Y. Ohashi, Y. Ueno, H. Naraoka, M. Tomita, & T. Nishioka, *J. Proteome Res*., **2** (2003) P.488.
9）K. Harada, E. Fukusaki, & A. Kobayashi, *J. Biosci. Bioeng*., **101** (2006) P.403.
10）K. Harada, Y. Ohyama, T. Tabushi, A. Kobayashi, & E. Fukusaki, *J. Biosci. Bioeng*., **105** (2008) P.249.
11）S. Kodama, A. Yamamoto, H. Terashima, Y. Honda, A. Taga, & S. Honda, *Electrophoresis*, **26** (2005) P.4070.

12）H. Katayama, Y. Ishihama, & N. Asakawa, *Anal. Chem*., **70** (1998) P.5272.
13）T. Soga, R. Baran, M. Suematsu, Y. Ueno, S. Ikeda, T. Sakurakawa, Y. Kakazu, T. Ishikawa, M. Robert., T. Nishioka, & M. Tomita, *J. Biol. Chem*., **281** (2006) P. 16768.
14）C. J. Bolten, P. Kiefer, F. Letisse, J. C. Portais, & C. Wittmann, *Anal. Chem*., **79** (2007) P.3843.

# 1．代謝産物量の定量
## b．安定同位体標識を利用した動的代謝プロファイリング

蓮沼　誠久[1)]，原田　和生[2)]，三宅　親弘[3)]，福崎英一郎[4)]

生体試料に含まれる代謝産物の量的情報をMSやNMRを利用して網羅的に解析する代謝プロファイリング技術は，微量な中間代謝物質を含む多様な化合物の一斉分析を可能にしたが，ここで得られる情報は代謝物質を抽出した時点での蓄積量のスナップショットであった．生体内で代謝物質が動的定常状態にある時，総量は変わらずに一定の同じ速度で分解と合成が行われて入れ替わっており，新規合成される物質の存在比率を知るためには安定同位体を用いた *in vivo* 標識が必須である．代謝プロファイリングと安定同位体標識法の組合せを利用した「動的代謝プロファイリング」は，代謝産物の量的変動を網羅的に観測することを可能にする．植物の環境変化やストレスに対する応答はシステマティックな代謝変動に基づくことが予想され，「動的代謝プロファイリング」はこうした複雑な応答機構の解明に寄与することが期待できる．

## Dynamic metabolic profiling using *in vivo* stable isotope labeling

Tomohisa Hasunuma, Kazuo Harada, Chikahiro Miyake, Eiichiro Fukusaki

Metabolic profiling technique has enabled to analyze the level of various metabolites including minor intermediates by using MS or NMR simultaneously, but the information available from the technique was snapshot *in vivo* at the time of sampling metabolites. In the dynamic steady state, metabolites are replaced with newly-synthesized compounds at a constant rate and the total amount of metabolites remains unchanged. Therefore, *in vivo* labeling with stable isotopes is necessary for the determination of turnover rates of metabolites. Dynamic metabolic profiling formed by the combination of metabolic profiling and stable isotope labeling technique enables to determine changes in metabolic flux exhaustively. In plants, responses to stress or environmental changes would be based on systematic variations in metabolism. The dynamic metabolic profiling would contribute to elucidate the complicated response mechanism.

### 1.b.1　はじめに

同位体を利用して代謝経路の特定の原子や分子をラベル（標識）し，その変化を追跡するトレーサー実験は，代謝研究に必須の技法の一つである．基本的に元素の化学的性質は電子配置，つまり原子番号で決まり，原子量にはよらないため，代謝物質中の特定原子のたどる道は，その原子を同位体でラベルして代謝経路（図1）での行動を調べれば分かる（同位体の質量差による反応速度の差を同位体効果というが，一般には無視できる）．同位体には，不安定で放射能を持ち崩壊する放射性同位体と，安定で崩壊しない安定同位体とがある．放射性同位体を用いたトレーサー実験はトレーサーが放出する放射線を鋭敏に検出できるため，Calvinらが $^{14}CO_2$ を用いて還元的ペントースリン酸経路の構成化合物を決定した[1)]ように，代謝経路や生体内物質の分布などの研究に幅広く使用されてきた．ただし，放射性核種を使用する放射性トレーサー実験は放射線防護に注意する必要があり，標識率を定量化できない，分子内の標識部位を識別することができないという欠点を有している．

安定同位体は質量分析（MS）計や核磁気共鳴（NMR）装置で検出することによりトレーサー実験に適用される．天然存在比が100%に近い $^{1}H$，$^{31}P$，$^{12}C$，$^{14}N$ といった原子に対し，例えば $^{13}C$ は1.1%，$^{15}N$ は0.4%しか存在しないため，これらの安定同位体を細胞内に取り込ませることにより，標識化された代謝反応を選択的に観測することが可能である．MSはイオン化した代謝産物を質量電荷比（$m/z$）にしたがって分離して検出するため，安定同位体標識された化合物は $m/z$ が分子内に含まれる安定同位体の数だけ増加した値を示す（図2）．したがって，安定同位体が含まれない主分子イオンと安定同

1）神戸大学大学院工学研究科
2）大阪大学大学院薬学研究科
3）神戸大学大学院農学研究科
4）大阪大学大学院工学研究科

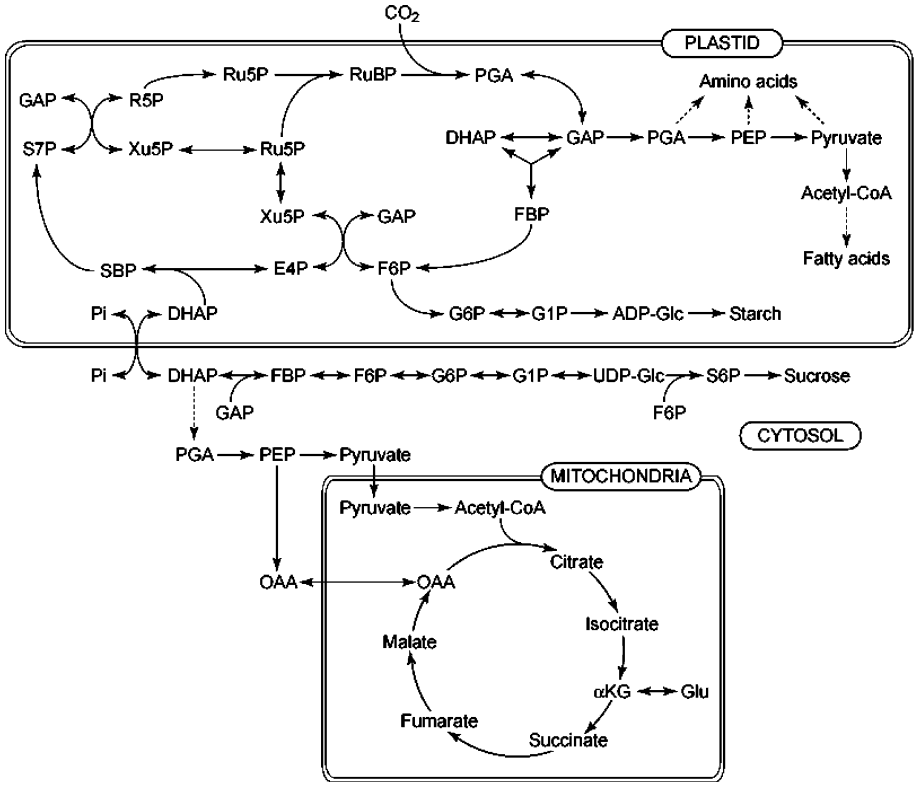



図1：炭素代謝の概略図
ADP-Glu; adenosine 5'-diphosphate glucose; DHAP, *dihydroxyacetonephosphate*; E4P, *erythrose* 4-phosphate; FBP, fructose 1, 6-bisphosphate; F6P, fructose 6-phosphate; GAP, *glyceraldehyde* 3-phosphate; G1P, glucose 1-phosphate; G6P, glucose 6-phosphate; *α*KG, *α-ketoglutarate*; OAA, *oxaloacetate*; PGA, *phosphoglycerate*; PEP, *phosphoenolpyruvate*; Pi, phosphoric acid; R5P, ribose 5-phosphate; *RuBP*, *ribulose* 1, 5-bisphosphate; Ru5P, *ribulose* 5-phosphate; S6P, sucrose 6-phosphate; S7P, sedoheptulose 7-phosphate; SBP, sedoheptulose 1, 7-bisphosphate; UDP-*Glu*, *uridine* 5'-diphosphate glucose; Xu5P, *xylulose* 5-phosphate

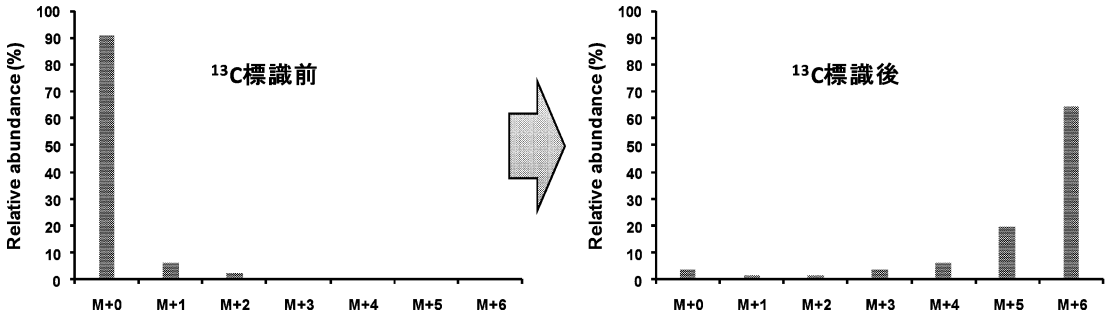



図2：$^{13}$C により標識化を受けた化合物（炭素数 6，分子量 M）の同位体濃縮を表す模式図．M＋*n* は *n* 個の $^{13}$C が取り込まれた化合物を表し，図は各アイソトポマーのアバンダンスを意味する．

位体を含む同位体イオンの強度比を観測することにより安定同位体標識率を算出することができる．また観測したい化合物が開裂して生じるフラグメントイオンは，試料分子の部分構造を反映するため，その構造が帰属できれば分子内の標識部位を識別することが可能になる[2]．MS は通常，ガスクロマトグラフィ（GC）や液体クロマトグラフィ（LC），キャピラリー電気泳動（CE）などの分離装置と連結して用いるため，分離モードを変えることにより幅広い化合物の分析に適用することが可能であり，分子量情報も得られるために分子種の同定においても有用である．NMR は，スペクトル情報から得られる化学シフトやスピン－スピン結合定数などの構造パラメーターを基に，標識化合物の同定や標識部位の特定を可能にする．混合物からでも複数種類の化合物の同定が可能な C-H COSY（correlation spectroscopy）や HMQC（hetero nuclear multiple quantum correlation）等の二

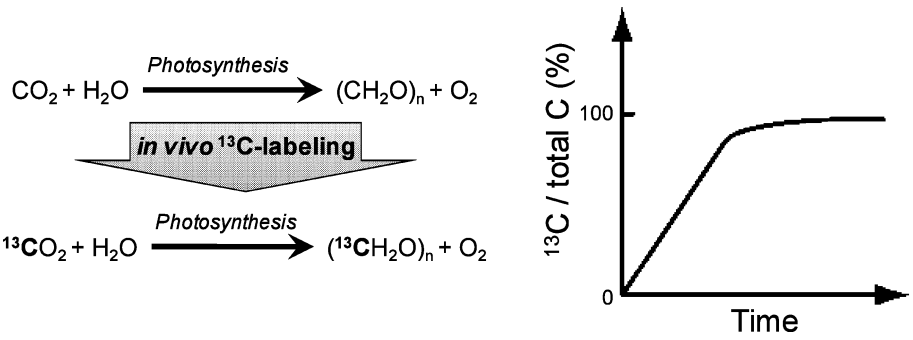



**図 3**：安定同位体を利用した *in vivo* 標識のコンセプト
定常状態から *in vivo* 標識を開始すると，生体内物質の炭素原子は $^{13}$C に置換される（左）．同位体による標識率の経時変化（右グラフの初期勾配）がターンオーバー速度を表す．

次元 NMR が汎用され[3,4]，化合物内での安定同位体標識の分布を定量的な情報として得ることができるのが NMR の強みである．一方 NMR には，感度がさほど高くないため微量な代謝中間体を検出できない，絶対量の測定には向かないといった弱点も有している．

安定同位体を利用した *in vivo* 標識後に，同位体標識の濃縮度分率を経時観測すれば，代謝のターンオーバーに関する情報を得ることができる（図 3）．近年，生体試料に含まれる代謝産物の量的情報を MS や NMR を利用して網羅的に解析する「代謝プロファイリング技術」の開発が進み，微量な中間体生成物を含む多様な化合物の一斉分析が可能になってきた[5–7]．こうしたメタボロミクス的手法のトレーサー実験への適用は，代謝物質の合成・分解といったターンオーバーに関する動的代謝プロファイリングを実現する．本稿では，トレーサー実験に広く用いられる安定同位体である $^{13}$C や $^{15}$N を用いた動的代謝プロファイリングについて記述する．

## 1.b.2 *in vivo* $^{13}$C 標識による動的代謝プロファイリング

$^{13}$C 標識した炭素源基質を細胞外から取り込ませ，代謝経路の中間代謝物の同位体分布を検出することができれば，含炭素化合物の代謝フラックスの観測が可能になる．代謝フラックスとは代謝ネットワーク中の物質の流れであり，代謝フラックスの観測は物質代謝の調節機構の理解に必須の手段である．代謝フラックスの観測手法は，はじめ，微生物（大腸菌や枯草菌，コリネ型細菌，酵母など）を対象に確立され，$^{13}$C 標識グルコースなどを炭素源として培養液中に加え，一定時間後の代謝産物の同位体分配率を調べることで，解糖系，ペントースリン酸経路，TCA 回路などの代謝フラックスが観測された．さらに個々の代謝経路のフラックス情報を統合し，物質収支や酵素反応速度のパラメーターを与えることにより，代謝ネットワークのモデル化が可能になった[8]．一方，植物の場合には，微生物と違って様々な制約があり，ネットワークレベルでのフラックス解析は難しいのが現状である．例えば，貯蔵組織の存在や転流，細胞内コンパートメント間の物質移動は代謝フラックスの数値モデル化を複雑化させる．さらに，物質代謝の定常状態を作り出すことが不可能であるため，外部から付与する摂動の影響を直接的に解析することができず，定常状態法による代謝フラックス解析[8] を適用することが原理的に不可能である．そこで，代謝フラックスの観測対象を植物材料に求める場合，培養細胞や胚，組織切片等が利用されている[9]．$^{13}$C 標識したグルコースやスクロースを炭素源として培地中に添加し，アミノ酸，有機酸，脂肪酸，スクロース，デンプン等の標識率と標識パターンを GC/MS や NMR で観測することにより解糖系や酸化的ペントースリン酸回路，TCA 回路に関する代謝フラックスが調べられてきた[10–13]．

光合成産物の生合成系を解析するためには，安定同位体標識した $^{13}CO_2$ を炭素源として植物に与え，代謝産物の $^{13}$C 標識率を求める実験が必要になる．$^{13}CO_2$ を利用した植物体の標識実験は 30 年以上前から行われているが[14]，多くの場合，分析対象となる化合物は糖類や二次代謝物質といった細胞内蓄積量の多い物質に限られていた．しかしながら近年，分析装置の検出機能の高感度化，スペクトル情報の高解像度化，データ取得速度の高速化等により網羅的な代謝プロファイリングが可能になり，代謝ネットワーク上の分岐点に位置する微量な中間代謝物質の分析が可能になってきた[15]．代表例として，Huege ら[2] はまず，水耕栽培したシロイヌナズナ幼植物体を光強度，$CO_2$ 濃度，温度および湿度の制御が可能なバイオチャンバーに移し，800 ppm $^{13}CO_2$ 雰囲気内で育種することにより，植物個体を丸ごと $^{13}$C 標識した（地上部では

91.5±10.5%，根では 90.2±9.7%の $^{13}C$ 標識率であった）．次に，標識個体に与える炭素源を $^{12}CO_2$ に切換えて安定同位体希釈を行い，一定時間後に採取した組織から代謝成分の抽出液を調製した．これを GC/MS 分析に供して，有機酸やアミノ酸，スクロースの経時的な標識化率の減少を観測することで代謝物質のターンオーバーを評価した．一般に水溶性の一次代謝産物には不揮発性の化合物が多く，GC/MS 分析の場合，揮発性を付与するための誘導体化（メトキシアミノ化およびトリメチルシリル化）処理が前処理として必要である．化合物の同定は，電子イオン化（electron ionization；EI）法により生じるフラグメントパターン（マススペクトル）とキャピラリカラムにおける保持時間の情報をもとに行った後，個々の化合物について $^{13}C$ 標識率を算出した．また，GC/EI-MS による標準化合物の分析結果はデータベース化されており，web サイト（http://csbdb.mpimp-golm.mpg.de/csbdb/gmd/gmd.html）からの照合が可能である．Huege らの実験では，約 100 のマスフラグメントの同定に成功し，経時的な同位体標識率の減少を観測することができた．

カルビン回路の中間代謝物である糖リン酸や糖ヌクレオチドを対象とした動的代謝プロファイリングを行う場合には，$^{13}CO_2$ による標識と標識化組織のサンプリングおよび化合物分析の方法に工夫が必要である．カルビン回路をはじめ，糖代謝の主要経路のターンオーバー速度は非常に速く[16]，*in vivo* のターンオーバーを正確に観測するためには，標識化組織の採集から代謝反応のクエンチングに要する時間をできるだけ短くすることが重要となる．また，短時間で標識を行う場合には $CO_2$ 固定速度を厳密に管理する必要があり，光合成速度に影響を与えるファクター（光強度，$CO_2$ 濃度など）の制御も必須となる．以下に標識化試料の調製手法を記す．

[実験方法]

1．光強度，$CO_2$ 濃度，相対湿度およびチャンバー温度の外部制御が可能な光合成チャンバーを作製し，この中で生葉の光合成を開始させる（この時点で用いる $CO_2$ は $^{12}CO_2$ とする．20,000 ppm $CO_2$ と 20%$O_2$ air を混合して調製したガスをチャンバー内に供給する．）．生葉の光合成速度は LI-COR 社製 LI-7000 $CO_2/H_2O$ ガスアナラザー等を用いてガス交換法により計測する．
2．30－60 分後に光合成速度が定常化したら，フィードする $CO_2$ ガスを $^{13}CO_2$ に切り替える．
3．一定の時間，$^{13}CO_2$ で光合成させる．
4．フリーズクランプシステム（筆者らが用いているのは光信理化学製作所製光合成同化箱フリーズクランパー）を用いて $\phi$ 30 mm の葉切片をカットすると同時に液体窒素でこれを凍結させる．
5．凍結切片をピンセットで取り出して液体窒素につけた後，－80°Cで保管しておく．

糖リン酸や糖ヌクレオチドは，生体内含量が微量であり，高い極性を有する点で分析方法についても工夫が必要である．筆者らは CE/MS による分離・検出を行っているが，以下に分析上の注意点を挙げる．まず，高極性化合物は汎用的な逆相の HPLC での分離が困難であるため，陰イオン交換クロマトグラフィやイオンペア液体クロマトグラフィ，キャピラリー電気泳動（CE）などによる分離が必要になる．一般に，陰イオン交換クロマトグラフィでは MS 導入前に中和用のサプレッサーを導入する必要がある，イオンペア液体クロマトグラフィではイオンペア試薬によるイオン化抑制効果が避けられない，といった難点があり，MS と連動して使用する場合には条件設定に注意を要する．一方で CE は汎用性が高いとはいえず，安定した分離と保持時間を得るためには分析対象組織に合わせた分離条件の最適化が必要である．CE の分離条件については「1）CE/MS による陰イオン性代謝物の定量点」に詳細な記述がある．次に，微量成分の検出については，より高感度な検出が可能な質量分析装置を用いることが望ましく，分析試料は前処理操作により夾雑物をできるだけ排除しておくことが重要である．以下に分析試料の調製方法[17]を記す．

[実験方法]

1．100 mg 湿重量の植物組織を水／メタノール／クロロホルム（2：5：5）の混合溶液中で攪拌・破砕する．
2．上記混合液の 1/6 容量の水を添加・混合・遠心した後，水溶性画分を回収する
3．回収液を分子量カット 5,000 の限外濾過膜を通過させて得られた濾液を減圧乾固する．
4．得られた残渣を蒸留水で溶解したものを分析試料として CE/MS に供する．

筆者らは検出に三連四重極リニアトラップ型の質量分析装置を用いて multiple reaction monitoring（MRM）方式による観測を行っている．図 4 にはホスホグリセリン酸，リブロース 1,5-ビスリン酸および UDP-グルコースの代謝ターンオーバーの観測結果を示す．対象とする化合物毎に MRM のパラメーターを最適化することに

より，カルビン回路内の主要代謝産物とグルコース 6-リン酸，ADP－グルコース，UDP-グルコースといったスクロース・デンプン生合成経路の代謝中間体や，アミノ酸，有機酸，アセチル CoA 等を検出することが可能である（表 1）[17]．

## 1.b.3 *in vivo* $^{15}$N 標識による動的代謝プロファイリング

植物は光合成に由来する化学エネルギーを用いて二酸化炭素，水，無機塩だけで生育することが可能である．植物体内に多く存在する炭素，酸素，水素は大気と水から得ることが可能である．次いで最も多く存在する窒素はそのほとんどが土壌中から吸収されるが，自然環境下では当該元素が最も欠乏しやすい．従って，カリウム，リンと並んで窒素は植物の成長速度を決定する栄養源となる場合が多い．また，光合成によって獲得した炭素は，植物体の窒素栄養状態によって分配先が制御され，その結果として植物の生長，形態形成にも影響を与える[18]．つまり，植物の生育にとって重要な窒素代謝は光合成とも密接に関係しており，C/N バランスによる代謝ネットワークの変動，それに伴う分化，形態形成の制御機構の解明は非常に重要な研究課題である．

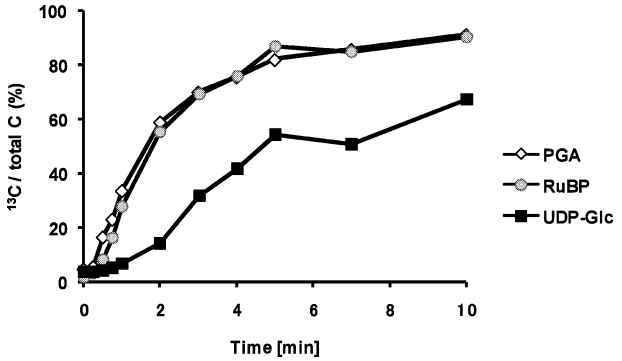



**図 4**：糖リン酸，糖ヌクレオチド類の $^{13}$C 濃縮度分率の経時変化
光強度 1,000 $\mu$mol m$^{-2}$s$^{-1}$，$CO_2$ 濃度 1,000 ppm，相対湿度 60%，チャンバー温度 25℃で光合成を行ったタバコ葉から抽出した成分を CE/MS 分析に供して各標識時間における $^{13}$C 標識率を調べた（蓮沼ら，論文準備中）．

**表 1**：CE/MS により $^{13}$C 標識率が測定可能なアニオン性代謝産物

| |
|---|
| リンゴ酸 |
| ホスホエノールピルビン酸 |
| グリセルアルデヒド 3-リン酸 |
| ジヒドロキシアセトンリン酸 |
| 3-ホスホグリセリン酸 |
| クエン酸 |
| イソクエン酸 |
| リボース 5-リン酸 |
| リブロース 5-リン酸 |
| グルコース 6-リン酸 |
| フルクトース 6-リン酸 |
| グルコース 1-リン酸 |
| セドヘプツロース 7-リン酸 |
| リブロース 1, 5-ビスリン酸 |
| フルクトース 1, 6-ビスリン酸 |
| フルクトース 2, 6-ビスリン酸 |
| セドヘプツロース 1, 7-ビスリン酸 |
| UDP-グルコース |
| ADP-グルコース |
| アセチルコエンザイム A |

植物に含まれる代謝産物にはアミノ酸，ポリアミン，核酸，アルカロイドなど窒素を含む有機化合物が非常に多い．このことは安定同位体である $^{15}$N で標識した硝酸カリウムや硝酸アンモニウムなどの無機塩のみを窒素源とすることで，多くの化合物を同位体標識することが可能となり，ネットワークレベルでの動的代謝プロファイリングが実行できることを示している．従って，*in vivo* $^{15}$N 標識による動的代謝プロファイリングは窒素代謝の代謝変動，そして窒素代謝と光合成の関係を解明する上で非常に有用であると考えられる．

*in vivo* $^{15}$N 標識による動的代謝プロファイリングの特徴として次のような点が挙げられる．i) 多くの含窒素化合物はアミノ酸から派生して合成されるので，前駆体であるアミノ酸から測定対象となる含窒素化合物までの中間体の $^{15}$N 標識率を経時的に測定することにより，当該経路の詳細な代謝フラックスを解析することが可能である．ii) 無機態窒素の $^{15}$N 標識体は $^{13}$C，$^{18}$O 標識化合物に比べ非常に安価であり，取り込みも簡便に行うことができる．iii) 炭素とは異なる，細胞内での窒素の分配，フラックスに関する知見を得ることができる．

*in vivo* $^{15}$N 標識による動的代謝プロファイリングではアミノ酸，ポリアミン，核酸などのような含窒素化合物が分析対象化合物となる．これらは前項で述べた糖リン酸，糖ヌクレオチドと同様に極性が非常に高く，汎用の HPLC では分離が困難である．従って，含窒素化合物を網羅的にプロファイリングする分析手法にも工夫が必要である．この場合においても前項で述べた CE/MS は非常に有用である．あらゆるアミノ酸，ポリアミン，核酸は pH が 2 以下の溶液中で正に帯電する．従って，pH が 2 以下の電解質を用いれば，これらの化合物群を誘導体化せずに CE によって分離することが可能である．また，通常 CE で用いられるフューズドシリカキャピラ

リーは酸性溶液に対し非常に安定であるため，低 pH の電解質を用いた CE は HPLC に匹敵する再現性を達成することが可能である[19]．さらに，解糖系やカルビンベンソン回路の中間体に比べ，アミノ酸やポリアミンは植物細胞内に高濃度で蓄積しているため，試料調製の際，濃縮の必要がない．また，MS 測定時に MRM ではなく，広範囲の $m/z$ 領域をスキャンすることでも十分検出可能であるため，同時に測定可能な化合物の数も増え，ノンターゲットの代謝プロファイリングも可能である．含窒素化合物を対象とした CE/MS プロファイリングにはこのような分析技術の面でも優位性が存在する．

著者らはモデル植物であるシロイヌナズナの培養細胞 T 87 を明，暗条件，各々において *in vivo* $^{15}$N 標識による動的代謝プロファイリングを行った[20]．代謝プロファイリングには CE/MS を用いた．その結果，無機窒素体の受容体であるグルタミンやグルタミン酸の $^{15}$N 標識率は大きく変化しないにも関わらず，プロリンや芳香族アミノ酸の $^{15}$N 標識率が暗黒下で大きく低下していることを明らかにした．

$^{15}$N 標識無機窒素塩による *in vivo* 標識はタンパク質のような高分子のターンオーバー解析にも用いることが可能である．$^{13}CO_2$ を取り込ませ，タンパク質あるいはその消化物であるペプチドを MS により解析した場合，スペクトルは非常に複雑になり，解析が困難であるが，$^{15}$N で標識する場合，分子内に存在する窒素原子の数が炭素に比べ，圧倒的に少なく，解析が容易である．$^{15}$N 標識した硝酸カリウムで培養し，体内の窒素がほぼ 100％となった植物体を作成し，タンパク質の構造を NMR により解析した例も報告されている[21]．ルビスコや光化学系複合体を構成するタンパク質は，他のタンパク質に比べ圧倒的に量が多く，光合成活性に直接関与する．様々な環境下においてこれら光合成に直接関与するタンパク質のターンオーバーを解析することにより，光合成の制御機構解明につながることが期待される．

## 1.b.4　おわりに

*in vivo* 安定同位体標識法と代謝プロファイリング技術の組み合わせは，代謝物質の合成・分解に関するダイナミックな量的変動の網羅的な観測を可能にするため，代謝変動の全体像を定量化することができる．植物の環境変化やストレスに対する応答は遺伝子レベルや代謝レベルでのシステマティックな変動に基づくことが予想され，「動的代謝プロファイリング」はこうした複雑な応答機構の理解に寄与することが期待できる．また応用面からは，炭素や窒素の分配の速度論的な理解を可能にし，植物の物質生産性の向上につながる律速酵素反応を明らかにすることが期待できる．例えば遺伝子工学的手法による律速酵素の過剰発現は当該代謝フラックスを強化し，最終産物の生産量を増大させる可能性が高い．一方で，*in vivo* での代謝変動をより正確に把握できるか否かは同位体標識を施す試料の調製方法と標識方法の成否が鍵を握っており，今後も研究目的に応じた標識システムの構築に取り組んでいく必要がある．

## 参考文献


1）M. Calvin. *J. Chem. Soc. (London)* (1956) p.1895
2）J. Huege et al., *Phytochemistry* **68** (2007) p.2258
3）G. Sriram et al., *Plant Physiol*. **136** (2004) p.3043
4）G. Sriram et al., *Phytochemistry* **68** (2007) p.2243
5）O. Fiehn et al., *Nat Biotechnol*. **18** (2000) p.1157
6）J. Kikuchi et al., *Plant Cell Physiol*. **45** (2004) p.1099
7）S. Sato et al., *Plant J*. **40** (2004) p.151
8）G. Stephanopoulos et al., Metabolic Engineering, Principles and Methodologies, Academic Press, San Diego (1998)
9）J. Schwender. *Curr. Opin Biotechnol*. **19** (2008) p.131
10）M. Dieuaide-Noubhani et al., *J. Biol. Chem*. **270** (1995) p.13147
11）V. Iyer et al., *Plant Cell Environ*. **31** (2008) p.506
12）D. Rontein et al., *J. Biol Chem*. **277** (2002) p.43948
13）J. Schwender et al., *J. Biol. Chem*. **278** (2003) p.29442
14）J. Schaefer et al., *Plant Physiol*. **55** (1975) p.1048
15）W. Römisch-Margl et al., *Phytochemistry* **68** (2007) p.2273
16）T. C. Sharkey et al., *Plant Physiol*. **81** (1986) p.788
17）K. Harada et al., *J. Biosci. Bioeng*. **105** (2008) p.249
18）A. Ikeda et al., *Protein, Nucleic Acid and Enzyme* **48** (2003) p.2103
19）T. Soga et al., *Electrophoresis* **25** (2004) p.1964
20）K. Harada et al., *Biotechnol. Prog*. **22** (2006) p.1003
21）J. H. Ippel et al. *Proteomics* **4** (2004) p.226

# 1．代謝産物量の定量
## c．硝酸還元酵素及び亜硝酸還元酵素の活性測定

前田　真一[1)]，上坂　一馬[1)]，小俣　達男[1)]

光合成生物の多くは，硝酸イオンをアンモニアに還元し有機窒素化合物を合成する硝酸同化機構を持っているため，硝酸イオンを窒素源として利用できる．本章では植物及びラン藻の硝酸還元酵素及び亜硝酸還元酵素の活性測定方法について紹介する．

## Assay of the Activities of Nitrate Reductase and Nitrite Reductase in Photosynthetic Organisms

Shin-ichi Maeda, Kazuma Uesaka, Tatsuo Omata

Nitrate, which is a major source of nitrogen for photosynthetic organisms, is reduced to ammonium by the sequential action of nitrate reductase and nitrite reductase.　In this chapter, we describe the methods to measure the activities of nitrate reductase and nitrite reductase in photosynthetic organisms.

### 1.c.1　硝酸還元酵素及び亜硝酸還元酵素の種類

硝酸還元酵素は，硝酸イオンを亜硝酸イオンに還元する反応を触媒する酵素である．光合成生物には，電子供与体としてフェレドキシンを用いる酵素とNAD(P)Hを用いる酵素があり，いずれもモリブデン酵素である．

亜硝酸還元酵素は，亜硝酸イオンをアンモニアに還元する反応を触媒する酵素である．光合成生物の亜硝酸還元酵素は，シロヘムを持ち，フェレドキシンを電子供与体として用いる．

### 1.c.2　実験方法

#### 1.c.2.1　NAD(P)H依存型硝酸還元酵素の活性測定（植物組織）[1)]

1．植物組織（約100 mg）を液体窒素で凍結させ，乳鉢と乳棒を用いて粉砕し，酵素抽出液（50 mM HEPES-KOH pH 7.5，5 mM EDTA，10 mM 2-メルカプトエタノール，1 mM DTT，0.5 mM PMSF，5 mg ポリビニルピロリドン）300 μlに懸濁し，遠心（15,000×g，3分）後，その上清を酵素溶液として回収する．

2．酵素溶液100 μlに反応溶液（50 mM HEPES-KOH pH 7.5，1 mM DTT，2 mM $KNO_3$）150 μlを加え，30℃で1分間インキュベートする．

3．0.6 mM NADH（またはNADPH）溶液50 μlを加えて反応を開始させる．

4．経時的（5分おき）に50 μlサンプリングし，直ちに450 μlの氷冷した水と混合し，激しく撹拌することで反応を停止させる．NADH（またはNADPH）を空気中の酸素と反応させることで酸化し，反応を停止させる．

5．反応液中の亜硝酸イオンの濃度を測定し，その増加速度から硝酸還元酵素活性を算出する．

高等植物の硝酸還元酵素は，翻訳後修飾により活性調節を受けている．リン酸化された硝酸還元酵素は，14-3-3タンパク質と結合し不活性化される[2)–4)]．この翻訳後修飾には2価のカチオンが必要であるため[5)]，酵素抽出液中のEDTAの代わりに$MgCl_2$を加えると，活性化状態の硝酸還元酵素の活性のみ測定することができる．

#### 1.c.2.2　フェレドキシン依存型硝酸還元酵素の活性測定（ラン藻）[6)]

フェレドキシンを電子供与体とする硝酸還元酵素（および亜硝酸還元酵素）の活性測定には，$Na_2S_2O_4$により還元したメチルビオローゲンを電子供与体として用いるのが一般的である．

1．ラン藻細胞（0.2～0.5 mgChl）を遠心（2,000×g，10分）により回収し，無窒素培地[注1]で洗浄後，無窒

1）名古屋大学大学院生命農学研究科　生物機構・機能科学専攻　分子細胞機構学講座（植物分子生理学研究分野）

素培地 1 ml に懸濁する．細胞質膜の透過性を高めるために，細胞懸濁液にトルエン 25 μl を加え，2 分間激しく撹拌する．

2．6 mM $KNO_3$ を含む炭酸緩衝液（120 mM $NaHCO_3$/$Na_2CO_3$，pH 10.5）2.43 ml を試験管に入れ，30°C に保温しておく．

3．これに 100 mM メチルビオローゲンを 0.12 ml，トルエン処理した細胞懸濁液を 0.15 ml 加え，30°C で 5 分間インキュベートする．

4．次に 100 mM $Na_2S_2O_4$（0.3 M $NaHCO_3$ に溶解する）を 0.3 ml 加え反応を開始する（メチルビオローゲンが $Na_2S_2O_4$ により還元されることで反応液が青色に変わる）．

5．経時的（3～5 分ごと）に 0.5 ml サンプリングし，（反応液の色が $Na_2S_2O_4$ を加える前の色に戻るまで）激しく撹拌する．$Na_2S_2O_4$ を空気中の酸素と反応させることで酸化し，反応を停止させる．

6．反応液を遠心（15,000×g，1 分）し，上清を回収し，反応産物である亜硝酸イオンの濃度を測定する．亜硝酸イオン濃度の増加速度から硝酸還元酵素活性を算出する．

注1 無窒素培地

ラン藻培養用培地 BG11[7] のクエン酸鉄（Ⅲ）アンモニウム，硝酸ナトリウム，硝酸コバルトをそれぞれ同濃度のクエン酸鉄（Ⅲ）水和物，塩化ナトリウム，塩化コバルトで置換して作製する．培地の pH は，20 mM HEPES-KOH で 8.2 に合わせる．

### 1.c.2.3 フェレドキシン依存型亜硝酸還元酵素の活性測定（植物組織）[1]

1．2-1 の 1 と同じ

2．酵素溶液 50 μl に反応溶液（50 mM HEPES-KOH pH 7.5，1 mM DTT，2 mM メチルビオローゲン，1.5 mM $NaNO_2$）200 μl を加え，30°C で 1 分間インキュベートする．

3．60 mM $Na_2S_2O_4$（0.3 M $NaHCO_3$ に溶解する）を 50 μl 加え反応を開始する（メチルビオローゲンが $Na_2S_2O_4$ により還元されることで反応液が青色に変わる）．

4．経時的（5 分おき）に 50 μl サンプリングし，直ちに 450 μl の氷冷した水と混合し，（反応液の色が $Na_2S_2O_4$ を加える前の色に戻るまで）激しく撹拌することで反応を停止させる．$Na_2S_2O_4$ を空気中の酸素と反応させることで酸化し，反応を停止させる．

反応液中の亜硝酸イオンの濃度を測定し，その減少速度から亜硝酸還元酵素活性を算出する．

### 1.c.2.4 フェレドキシン依存型亜硝酸還元酵素の活性測定（ラン藻）[8]

1．2-2 の 1 と同じ

2．1.5 mg/ml 臭化セチルトリメチルアンモニウム 0.15 ml と MOPS 緩衝液（40 mM MOPS-NaOH，pH 7.2）1.98 ml を試験管に入れ，30°C に保温しておく．

3．これにトルエン処理した細胞懸濁液を 0.3 ml 加え，30°C で 5 分間インキュベートする．

4．次に 100 mM メチルビオローゲンを 0.12 ml，10 mM $NaNO_2$ を 0.15 ml 加え，30°C で 5 分間インキュベートする．

5．さらに 200 mM $Na_2S_2O_4$（0.3 M $NaHCO_3$ に溶解する）を 0.3 ml 加え反応を開始する（メチルビオローゲンが $Na_2S_2O_4$ により還元されることで反応液が青色に変わる）．

6．経時的（3～5 分ごと）に 0.5 ml サンプリングし，（反応液の色が $Na_2S_2O_4$ を加える前の色に戻るまで）激しく撹拌する．$Na_2S_2O_4$ を空気中の酸素と反応させることで酸化し，反応を停止させる．

7．反応液を遠心（15,000×g，1 分）し，上清を回収し，基質である亜硝酸イオンの濃度を測定する．亜硝酸イオン濃度の減少速度から亜硝酸還元酵素活性を算出する．

### 1.c.2.5 亜硝酸イオン濃度の測定[9]

1．スルファニルアミド 0.5 g，N-1-ナフチルエチレンジアミン二塩酸塩 0.01 g，塩酸 6.25 ml，蒸留水 141.25 ml を混合し，発色試薬を作る．

2．サンプル 0.05 ml を発色試薬 2.95 ml と混合し，15 分反応後，540 nm の吸光度を測定する．検量線作成には，0～0.5 mM の亜硝酸イオン溶液を用いる．

## 参考文献


1）Wray, J. L., and Fido, R. J. (1990) in *Methods in Plant Biochemistry* (Dey, P. M., and Harborne, J. B., eds) Vol. 3, pp.241-256, Academic Press, London

2）Huber, S. C., Bachmann, M., and Huber, J. (1996) *Trends Plant Sci*. **12**, 433-438

3）Moorhead, G., Douglas, P., Morrice, N., Scarabel, M., Aitken, A., and MacKintosh, C. (1996) *Curr. Biol*. **6**, 1104-1113

4）Su, W., Huber, S. C., and Crawford, N. M. (1996) *Plant Cell* **8**, 519–527
5）Athwal, G. S., Huber, J. L., and Huber, S. C. (1998) *Plant Cell Physiol*. **39**, 1065–1072
6）Herrero, A., Flores, E., and Guerrero, M. G. (1981) *J. Bacteriol*. **145**, 175–180
7）Stanier, R. Y., Kunisawa, R., Mandel, M., and Cohen-Bazire, G. (1971) *Bacteriol. Rev*. **35**, 171–205
8）Herrero, A., and Guerrero, M. G. (1986) *J. Gen. Microbiol*. **132**, 2463–2468
9）Snell, F. D., and Snell, C. T. (1949) in *Colorimetric Methods of Analysis* Vol.2, pp.802–807, Van Nostrand, New York

# 1．代謝産物量の定量
## d．活性酸素種，抗酸化物

真野　純一[1)]，Sergey Khorobrykh[1,2)]，尼子　克己[3)]

光合成に伴い生成する活性酸素種は，細胞のレドックスシグナルとして作用すると同時に環境ストレス障害の要因ともなる．活性酸素には化学的特性の異なるいくつかの分子種があり，それぞれ特異的な検出法がある．活性酸素種およびそれを消去するアスコルビン酸やグルタチオンなどの還元剤は，寿命が短い，相互の酸化還元反応が容易に進行する，といった特性をもつため，定量的な抽出・測定に注意を要する．この節では，チラコイド膜を用いる活性酸素生成機構解析，組織抽出液の過酸化物，酸化タンパク質，抗酸化物の定量法を中心に解説する．

## Reactive Oxygen Species and Antioxidants Associated with Photosynthesis

Jun'ichi Mano, Sergey Khorobrykh, Katsumi Amako

Photosynthesis reactions are intrinsically accompanied by the production of reactive oxygen species (ROS) such as superoxide anion radical ($O_2^{\cdot-}$), hydrogen peroxide, singlet oxygen ($^1O_2$) and hydroxyl radical ($HO^{\cdot}$), which influence the productivity and stress responses of plants. Selected methods for determining individual ROS in vitro and in vivo and for evaluating the redox status of ascorbate and glutathione in plant tissue extracts are described, with specific precautions.

### 1.d.1　はじめに

C 3 光合成を行う葉での典型的な活性酸素生成フラックス（$H_2O_2$ 換算）は，試算によると葉緑体で 4,000 nmol $m^{-2}s^{-1}$，ペルオキシソームで 10,000 nmol $m^{-2}s^{-1}$，ミトコンドリアで 200 nmol $m^{-2}s^{-1}$ 程度である[1)]．ペルオキシソームの $H_2O_2$ 生成はほとんどグリコール酸オキシダーゼ反応によるが，葉緑体では主要な活性酸素反応は 2 つある（図 1）[2,3,4)]．ひとつはいわゆる Mehler 反応で，光化学系 I（PSI）で $O_2$ が一電子還元されスーパーオキシド（$O_2^{\cdot-}$）が生成し，$O_2^{\cdot-}$ の不均化反応で $H_2O_2$ が生成する[5,6)]．もう一つは光化学系 II（PSII）での一重項酸素（$^1O_2$）生成である[7)]．この他にも PSII 還元側での $O_2^{\cdot-}$ 生成[8)]，それに由来する $H_2O_2$，ヒドロキシルラジカル（$HO^{\cdot}$）の生成[9)]，$H_2O$ 酸化酵素が機能しないときの PSII 酸化側での酸化力による活性種の生成[10)]，プラストセミキノンによる $O_2^{\cdot-}$ 生成[11)]，亜硝酸，アスパラギンからの一酸化窒素（$NO^{\cdot}$）生成[12)] などの可能性が指摘されている．

活性酸素には化学的特性の異なる複数の分子種があり，検出法はそれぞれに特異的である．また，研究目的と材料に応じて最適な測定手法は異なる．例えば活性酸素生成機構解明にはチラコイド膜などを材料とした in vitro 測定，酸化的損傷・ストレス耐性の評価には過酸化物やアルデヒドなどの組織からの抽出・定量，活性酸素のシグナル作用解明には蛍光プローブなどを用いた組織の in situ 観察が行われる．各手法の原理と限界を理解することが，結果の正しい解釈には不可欠である．本節ではまず活性酸素測定法を研究目的と検出法の特徴によって分類し，研究目的に応じた測定手段選択のガイドラインを提供する．その後 in vitro 測定，in situ 測定の具体例をいくつか紹介する．

なお，$NO^{\cdot}$，ペルオキシ亜硝酸（$ONOO^-$）など活性窒素種の植物試料での測定については最近の文献[12,13,14,15)]を参照されたい．より広範な活性酸素，酸化ストレスマーカーの測定法の成書もある[16,17)]．測定の限界やアーテファクトの原因は活性酸素種の化学的性質と密接に関連している．基礎的理解のため総説，成書[18,19,20)] を一読されることをお薦めする．

1）山口大学総合科学実験センターアイソトープ分析施設
2）Institute of Basic Biological Problems, Russian Academy of Sciences
3）神戸学院大学栄養学部

### 1.d.2　活性酸素種の特性と検出法の選択

活性酸素とは酸素分子（$O_2$）に由来する反応性の高い分子種の総称で，「活性酸素種」という表現がより正確で

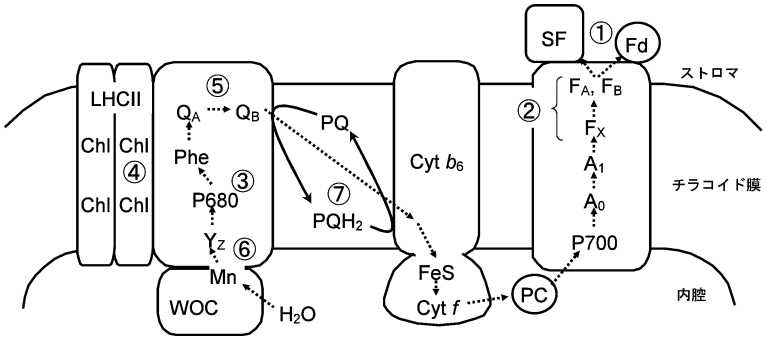



**図1**：葉緑体電子伝達に伴う活性酸素生成．点線は電子伝達経路を表す．

① PSI ストロマ側での $O_2$ 還元による $O_2^{\cdot-}$ 生成．触媒としてグルタチオンレダクターゼ，モノデヒドロアスコルビン酸レダクターゼ（MDAR）などストロマのフラビンタンパク（SF）[6]，フェレドキシン（Fd）が考えられる．

② PSI 還元側の鉄硫黄センター $F_X$，$F_A$，$F_B$ の自動酸化による $O_2^{\cdot-}$ 生成．

③ PSII 反応中心での $^1O_2$ 生成．

段階 1：プラストキノンプールが過還元状態となり，$Q_A/Q_A^-$ の還元レベルが上昇すると，$P680^+$ と $Q_A^-$ の電荷再結合の確率が高まり P680 の励起三重項状態 $^3P680^*$ が形成される．

$$P680^+ + Q_A^- \rightarrow {}^3P680^* + Q_A$$

段階 2：$^3P680^*$ から基底状態酸素分子（$^3O_2$）へのエネルギー移動で $^1O_2$（励起一重項状態）が生成．

$$^3P680^* + {}^3O_2 \rightarrow P680 + {}^1O_2$$

④ アンテナクロロフィルでの $^1O_2$ 生成（$^3Chl^*$，$^1O_2$ の消去剤であるカロテノイドが欠損すると起こりうる）．

⑤ PSII 還元側での $O_2$ 還元による $O_2^{\cdot-}$ 生成[8]．

⑥ PSII 酸化側での $P680^+$，$Chl^+$，$Y_Z^+$ などによる周辺分子の酸化により生成する有機ラジカル（R·）が $O_2$ と反応し，ペルオキシルラジカル，有機ペルオキシド，さらにアルコキシルラジカルを生成する[10]．

⑦ プラストセミキノンラジカル（$PQH^{\cdot-}$）の $O_2$ 還元による $O_2^{\cdot-}$ 生成[11]．

$$PQH^{\cdot-} + O_2 \rightarrow PQ + O_2^{\cdot-} + H^+$$

いったん $O_2^{\cdot-}$ が生成すると，プラストキノール $PQH_2$ を酸化し $PQH^{\cdot-}$ を再生する．

$$O_2^{\cdot-} + PQH_2 \rightarrow PQH^{\cdot-} + H_2O_2$$

ある．本節の活性酸素種の表記は IUPAC Recommendations 2000[21] およびその簡略版[22] に従う（表 1）．ここに含まれる分子種の性質は，それぞれの酸化力（酸化還元電位）および，ターゲットとの反応性（二次反応速度定数）により異なる[20]．

表 2 に活性酸素測定法を目的および分子種ごとに整理した．葉緑体やチラコイド膜を用いると，光照射時の活性酸素種生成をリアルタイムで検出できる．これは活性酸素の生成速度または定常濃度測定である．組織からの過酸化物，酸化生成物抽出では，含量が得られる．これ

**表 1**：活性酸素種の種類と性質

| 活性酸素種 | 表記 | |
|---|---|---|
| スーパーオキシド（アニオン）ラジカル | $O_2^{\cdot-}$ | 酸化力は中程度で，還元剤としても働く．プロトン化（p$K$a＝5.5）したスーパーオキシドラジカル $HO_2^{\cdot}$ は，アニオン型より酸化力が強く，中性分子なので膜にも溶け込む． |
| 過酸化水素 | $H_2O_2$ | 酸化力は中程度で，還元剤としても働く．中性分子で生体膜を通過する．金属触媒が存在しなければきわめて安定．ラジカルではない． |
| ヒドロキシルラジカル | $HO^{\cdot}$ | 酸化力，反応性ともに極めて大きく，ほとんどの有機，無機分子と拡散律速で反応し酸化する． |
| 一重項酸素 | $^1O_2$ | 酸化力，反応性ともに大きい．励起電子のエネルギー準位により $^1\Sigma_g^+$ 状態と $^1\Delta_g$ 状態に区別される．本稿で $^1O_2$ の表記は後者の意．$^1\Sigma_g^+$ は寿命が極めて短く生化学的に重要でない．$^1\Delta_g$ の寿命は $H_2O$ 中で 3.8 $\mu$s，$D_2O$ 中で 62 $\mu$s． |
| 過酸化脂質（有機ペルオキシド） | LOOH（ROOH） | 酸化力，安定性は $H_2O_2$ と似ている．ラジカルではない． |
| 脂質（有機）ペルオキシルラジカル | LOO·（ROO·） | ラジカル連鎖反応の中間体で定常濃度は低い． |
| アルコキシルラジカル | LO·（RO·） | HO· と似た性質を持つ．酸化力が強く，寿命が短い． |
| 一酸化窒素 | NO· | 酸化力は中程度で，還元剤としても働く．中性分子で生体膜を通過する． |
| ペルオキシ亜硝酸 | $ONOO^-$ | NO· と $O_2^{\cdot-}$ の結合で生成する．きわめて反応性が高い．ラジカルではない． |

**表 2**：試料の種類と活性酸素種に応じた分析法

| | $^1O_2$ | $O_2^{\cdot-}$ | $H_2O_2$ | $HO^{\cdot}$ | LOOH | その他 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 生組織，細胞 | DanePy<br>蛍光減少<br>SOSG 蛍光 | NBT 染色<br>蛍光プローブ<br>DCF 蛍光* | DAB 染色<br>DCF 蛍光* | DCF 蛍光*<br>※ | 化学発光<br>DCF 蛍光* | ESR（Asc）<br>DCF 蛍光* |
| 組織抽出液 | LOOH　分析<br>（LC/MS/MS） | ※※ | FOX 吸光<br>ルミノール<br>発光 | ※※ | Spy-LHP 蛍光<br>TBARS（MDA） | 酸化タンパク質<br>ASA/DHA<br>GSH/GSSG |
| 葉緑体 | DanePy<br>蛍光減少 | | $O_2$ 測定<br>（カタラーゼ法） | | Spy-LHP 蛍光<br>TBARS | |
| チラコイド膜 | DanePy<br>蛍光減少<br>His/RNO 法 | Cyt *c* 還元<br>スピントラップ<br>ESR | $O_2$ 測定<br>（カタラーゼ法） | スピントラップ<br>ESR | Spy-LHP 蛍光<br>TBARS | スピントラップ<br>ESR |
| 特異的消去剤 | $N_3^-$ イオン（水系）<br>$\beta$-カロテン（膜系） | SOD | カタラーゼ | （マンニトール，<br>Hepes など）<br>※※※ | | |
| その他 | 重水（$D_2O$）中では寿命が 20 倍長いため，検出レベルが上がる． | | | Fenton 反応による生成はキレート剤（DTPA など）で抑えられる． | | |

* ジクロロジヒドロフルオレセイン（$DCFH_2$；非蛍光）は $HO^{\cdot}$ などによって非酵素的に酸化され蛍光性のジクロロフルオレセイン（DCF）となる．過酸化物（$H_2O_2$，ROOH）による $DCFH_2$ 酸化はペルオキシダーゼに依存する．すなわち細胞での DCF 蛍光増大は非特異的な活性酸素種増大の指標である．$DCFH_2$ は光でも酸化されるため，光照射する試料には適さない．光酸化を受けにくい hydroxyphenyl fluoresein, aminophenyl fluoresein（Alexis Biochemicals）が販売されているが，植物試料への適用例はまだない．

※ 細胞内 $HO^{\cdot}$ の特異的検出法は確立されていない．

※※ 組織抽出液では ASA 等の還元剤が遊離金属イオンの触媒により自動酸化され，$O_2^{\cdot-}$ が生じる．$O_2^{\cdot-}$ は不均化して $H_2O_2$ を生じ，Haber-Weiss 反応（金属イオン触媒による $H_2O_2$ の還元的分解）で $HO^{\cdot}$ が生成する．すなわち，抽出液で検出される $O_2^{\cdot-}$，$HO^{\cdot}$ は，遊離金属イオンと還元剤の存在を示しているにすぎない．

※※※ $HO^{\cdot}$ はほとんどの化合物と非選択的に反応するため，どんな物質も濃度に応じて $HO^{\cdot}$ を「消去」する効果をもつ．すなわち $HO^{\cdot}$ に「特異的な」消去剤があるわけではなく，ターゲットの濃度より過剰に（100 mM 程度）添加しても測定系，反応系に影響を与えない化合物（Hepes など）が消去剤として利用されるのである．

らの測定ではすぐれた定量性が得られる．一方，蛍光プローブなどを用いる in situ 測定では生成の積算量を見積もるが，定量性は高くない．このように測定法によって得られるパラメータが異なることに注意が必要である．また検出法（試薬）の活性酸素種に対する特異性にも注意を払う必要がある．表 2 にはさらに，個々の活性酸素種の特異的消去剤を記載した．検出されたシグナルが特異的消去剤によって低下すれば，その活性酸素種が検出された証拠のひとつとなる．

## 1.d.3　葉緑体，チラコイド膜を用いた in vitro 活性酸素測定

### 1.d.3.1　電子スピン共鳴

電子スピン共鳴（ESR，同じものを電子常磁性共鳴 EPR ともいう）測定は分光法であり，不対電子をもつ分子すなわちラジカルを直接検出する唯一の方法である．ESR では試料を強い磁場の中におき，ラジカル分子がもつ不対電子のスピンエネルギー準位（磁場のない状態では縮退している）を分裂させ，マイクロ波（数 cm 波長の電磁波）を照射し，共鳴により電子スピンが遷移するときの吸収を測定する．この共鳴エネルギーの大きさは不対電子の微環境（分子内の隣接原子など）によって決まるため，ラジカル分子種ごとに特徴的なスペクトルが得られる．紫外・可視領域の分光法とは異なり，マイクロ波の波長は固定したまま，磁場強度を変え（「掃引する」という）ラジカル分子の共鳴エネルギーレベルを変化させることでスペクトルを得る．マイクロ波吸収は微弱であり，S/N 比改善のために磁場変調という一種の微分測定（これを高周波数で行い平均化してノイズをキャンセルする）を行う．通常 ESR スペクトルとして示されるのはこの一次微分シグナルである．測定原理の詳細は成書を参照されたい[23,24]．

生物試料のラジカル測定に最もよく用いられる X バンド ESR のマイクロ波領域は $H_2O$ の分子振動と共鳴する．この不都合な水の影響を抑えるため，水系・常温で

の測定には，扁平な石英セルを用いる（注：凍結状態での測定には通常の石英管を使用する）．扁平セルは厚さ0.4 mm であり光照射を行う場合の光路長が短いため，試料のクロロフィル濃度を高くできる．

$O_2^{\cdot-}$ や HO· などは寿命が短く常温での定常濃度がきわめて低い．これらの測定には，ラジカル種と付加反応して寿命の長い有機ラジカルをつくる化合物（スピントラップ剤）を加え，生成したラジカル付加物（spin adduct）を検出する．スピントラップ剤なしで直接測定できるアスコルビン酸ラジカル（Asc·）は，スピントラップ剤の使用が難しい細胞や組織でのラジカル生成の指標として有用である（1 d.4.1 に記載）．（Asc· ラジカルはモノデヒドロアスコルビン酸，セミデヒドロアスコルビン酸，アスコルビン酸フリーラジカルとも標記される）しかし，アスコルビン酸（AsA）酸化による Asc· 生成は活性酸素に対する特異性がなく，in vitro での特異的活性酸素検出には不適当である．

### 1.d.3.1.1　PSII 膜への光照射で生じる $O_2^{\cdot-}$，HO· のスピントラップ検出

スピントラップ剤自体は ESR サイレントであり，ラジカル付加物となって ESR シグナルを生じる．付加するラジカルの種類により，ラジカル付加物の超微細結合定数が異なり特異的なスペクトルがあらわれる．水溶性スピントラップ剤で $O_2^{\cdot-}$，HO· 検出に比較的よく使われるのは *N*-*tert*-butyl-α-phenylnitrone（PBN），α-(4-pyridyl 1-oxide)-*N*-*tert*-butylnitrone（POBN），5,5-dimethyl-1-pyrroline *N*-oxide（DMPO）である．PBN や POBN の場合は，$O_2^{\cdot-}$ 付加物と HO· 付加物はいずれも 6 本線のよく似たシグナルを生じ，両者を一目で判別することは難しい．これに対し DMPO の $O_2^{\cdot-}$ 付加物（DMPO-OOH）と HO· 付加物（DMPO-OH）のスペクトルは明確に区別できる（図 2）．DMPO-OOH シグナルの検出は $O_2^{\cdot-}$ 生成の証拠となる．これに対し，DMPO-OH シグナルの検出から HO· 生成を立証する際は注意を要する．DMPO-OH シグナルはさまざまな酸化系で容易に検出されるが，DMPO-OH は DMPO の直接酸化反応でも生じる．また DMPO-OOH も 1 分程度で DMPO-OH に変化する（図 2 の実験例でも，DMPO-OOH からの DMPO-OH 生成が観測された）．HO· 生成の検証には，HO· によらない DMPO-OH 生成の可能性を排除する実験，すなわち（i）Fenton 反応を抑制するカタラーゼやキレート剤により DMPO-OH シグナルが低下する，（ii）SOD で DMPO-OH 生成が抑制されない，（iii）ジメチルスルホキシド添加により DMPO-OH シグナルが DMPO-$CH_3$ シグナルに変化する，などの確認が必要である．最近，DMPO-OOH より寿命の長い $O_2^{\cdot-}$ 付加物をつくる 5-(diethyloxyphosphoryl)-5-methyl-1-pyrroline *N*-oxide（DEPMPO）およびその類縁体の使用例が増えてきている[25]．

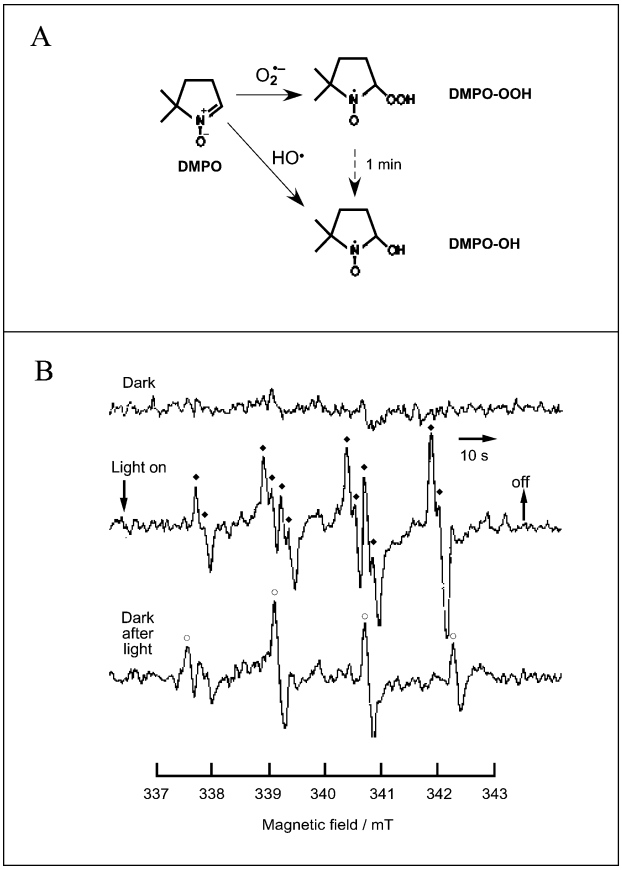



**図 2**：DMPO スピントラップ法による $O_2^{\cdot-}$，HO· の検出．A）DMPO の構造と DMPO-OOH，DMPO-OH の生成反応．DMPO-OH はこの他にも DMPO の直接酸化反応によっても生じる．B）PSII 膜標品への光照射による $O_2^{\cdot-}$ 生成の検出．光照射により，DMPO-OOH に特有の 2，4，4，2 本に分裂したシグナル（◆）が観測される．光照射停止後約 1 分で，DMPO-OOH シグナルは消失し，DMPO-OH（○）が生成する．

光合成反応系での使用に際してはスピントラップ剤が還元剤的性格をもち電子供与体または阻害剤となりうることに注意しなければならない．とくに $O_2^{\cdot-}$ の検出には比較的高濃度（50–100 mM）のスピントラップ剤が必要であり，その影響を別の実験で評価する必要がある．

また，複数のラジカル種が同時に生成すると，それぞれの付加物シグナルが重なり複雑なスペクトルが得られることがある．この場合は，予測される個別のスペクトルを，主要なラジカル付加物の超微細結合定数（文献値）からシミュレーションし，それらを線形結合させ，観測したスペクトルを近似する．これにより，もとのスペクトルを構成する成分とそれらの存在比率（※）を推定す

る．この機能はESR装置のデータ解析システムに備えられている．（※スピン濃度の比であり，ラジカル付加物の定常濃度比を示す．ただしラジカル付加物ごとに寿命が違うので，付加物の濃度比がもとのラジカルの濃度比を示すわけではない）

[実験方法]

1．用意するもの

(1) キレックス処理水．重金属イオンはラジカル反応を触媒するため，ラジカル測定に用いる水は，重金属の混入を最小限にする必要がある．キレックス100樹脂（バイオ•ラッド，142-2832）はキレート剤を表面に結合した樹脂である．樹脂30 gを適当なカラムに充填し，ここに蒸留水（ミリQ水など，できるだけ精製した水）1リットルを通し，集める．使用するガラス器具もキレックス水でゆすいでおく．

(2) DMPO 500 mM．DMPOは自動酸化によりラジカルとなることがある．試料を加えずDMPOだけでESR測定を行い，ラジカルが検出されないことを確認する．ラジカル種が混入している場合は以下の要領で精製する．

① 器具•容器はなるべくガラスを避け，プラスチック製のものを用いる．

② DMPO 1 gを9 mlのキレックス水に溶解し，約1.8 gの活性炭を加え，よく撹拌する．

③ ガラスフィルターろ過により活性炭を除く．（ガラスフィルターがない場合，遠心し，上清を0.45 μmメンブレンフィルターでろ過する）

④ 濃度測定のため，10 μl程度を95%エタノールで10,000倍希釈し，232 nmの吸光度（$\varepsilon$＝7,700 $M^{-1}cm^{-1}$）から希釈前の濃度を計算する．

⑤ キレックス水で500 mMに希釈し，プラスチック製マイクロチューブ中，−80°C冷凍保存する．この状態で数ヶ月間は安定である．

(3) ホウレンソウチラコイド膜から調製したPSII膜[26]．

(4) スーパーオキシドジスムターゼ（SOD）例えば*Bacillus* sp.由来Mn-SOD（和光純薬195-10291）

(5) 光照射用の窓を備えたESRキャビティ．

(6) 熱カットフィルターを備えた光源．

2．PSII膜（0.5 mg Chl $ml^{-1}$）を20 mM MES-NaOH，pH 6.5，10 mM $CaCl_2$，100 mM DMPOに懸濁し，石英フラットセル（4×45 mm，厚さ0.4 mm）に入れ（セルの上端にプラスチックの注射器（1 ml）を接続し，下端からゆっくり吸引する．気泡を残さないようにする），下端をキャップで閉じる．

3．フラットセルの平たい面が照射光に対し正面となるようESRキャビティ内に固定し，チューニングを行う．

4．以下の測定条件で磁場の掃引を行う．暗所ではラジカル付加物は検出されない（図2）．

| | |
|---|---|
| マイクロ波出力 | 5 mW |
| 磁場変調周波数 | 100 kHz |
| 磁場変調幅 | 0.079 mT |
| 時定数 | 0.3 s |

5．試料はそのままで，再度低磁場側から磁場掃引し，白色光（1,500 W $m^{-2}$，熱カットフィルター使用）をキャビティの窓から照射する．DMPO-OOHのシグナルが観測される．

6．光照射を止め，再度スペクトルを記録する．DMPO-OOHがDMPO-OHに変化するため，異なるスペクトルが得られる．

7．新たにSOD（10 units $ml^{-1}$）を添加した試料を調製し，上の4〜6と同様の測定を行う．光照射時のシグナルが観測されなくなることから，$O_2^{\cdot-}$付加物であったことが確認できる．

8．Fenton反応による$HO^{\cdot}$生成を阻害するカタラーゼ（60,000 units $ml^{-1}$），キレート剤（0.5 mM DTPA）を添加しても，光照射によるDMPO-OOHシグナル生成および光照射後のDMPO-OHシグナル生成は影響を受けない．このことからDMPO-OHはDMPO-OOHから変化して生じたもので，$HO^{\cdot}$とDMPOの付加反応によるものではないと考えられる．すなわちこの系では検出可能なレベルの$HO^{\cdot}$は生成しなかったといえる．

### 1.d.3.1.2 アスコルビン酸ラジカル（Asc$^{\cdot}$）の測定

in vitroでのAsc$^{\cdot}$ラジカル測定は，活性酸素生成の指標より，むしろチラコイド膜や葉緑体でのAsAやAsc$^{\cdot}$ラジカルそのものの代謝を解析するために行う．Asc$^{\cdot}$ラジカルがPSIの電子受容体であること[27]，また，AsAがチラコイド内腔でPSII，PSIの電子供与体となりAsc$^{\cdot}$ラジカルに変換されること[28,29]の証明に用いられた．

### 1.d.3.2 チラコイド膜への光照射による$O_2^{\cdot-}$生成の測定（Cyt *c* 還元法）[5]

酸化型シトクロム*c*（Cyt *c*(III)）が$O_2^{\cdot-}$により還元されると550 nmに強い吸収をもつ還元型（Cyt *c*(II)）になる（（還元型）−（酸化型）の分子吸光係数差：$\varepsilon_{550}$＝19,600 $M^{-1}cm^{-1}$）．

$$\text{Cyt } c(\text{III}) + O_2^{\cdot-} \rightarrow \text{Cyt } c(\text{II}) + O_2 \qquad (1)$$

チラコイド膜に酸化型 Cyt *c* を加え，光照射しながら 550 nm の吸光度増大により $O_2^{\cdot-}$ を検出する．吸光度増大が SOD 添加により阻害されれば $O_2^{\cdot-}$ 生成の証拠となる．$O_2^{\cdot-}$ による Cyt *c* 還元反応の 2 次反応速度定数 $1.4\times10^6\ M^{-1}s^{-1}$（pH＜7.4）に基づき，Cyt *c* 還元速度から $O_2^{\cdot-}$ の定常濃度が求められる．なお $O_2^{\cdot-}$ が Cyt *c* で 100％捕捉されるなら，（Cyt *c* 還元速度）＝（$O_2^{\cdot-}$ 生成速度）となるが，実際の捕捉率は 100％ではなく，この方法での $O_2^{\cdot-}$ 生成速度見積もりは過小になる．測定にはクロスイルミネーションのできる分光光度計が必要で，検出器には干渉フィルターで 550 nm の光のみを透過させ，試料の照射には 550 nm より長波長側の光（650 nm 以下をカットする赤色フィルターなど使用）を用いる．

### 1.d.3.3　チラコイド膜，葉緑体での $H_2O_2$ 生成速度（$O_2$ 測定/カタラーゼ法）

光化学系 I（PSI）での $O_2$ の光還元で生成する $O_2^{\cdot-}$ は $H_2O_2$ と $O_2$ に不均化する．この反応は酸素電極で酸素消費として測定できる．

$$2O_2+2e^-\rightarrow 2O_2^{\cdot-} \quad (2)$$

$$\underline{2O_2^{\cdot-}+2H^+\rightarrow H_2O_2+O_2} \quad (3)$$

$$O_2+2e^-+2H^+\rightarrow H_2O_2 \quad (4)$$

カタラーゼを充分量加えると，$H_2O_2$ が $O_2$ と $H_2O$ に不均化される．

$$H_2O_2\rightarrow H_2O+1/2O_2 \quad (5)$$

カタラーゼを加えたときと加えないときの $O_2$ 消費速度の差 $\Delta O_2$（$\mu M\ min^{-1}$）を求め，これを 2 倍することで，$H_2O_2$ 生成速度 $v_{H2O2}$（$\mu M\ min^{-1}$）を求める．

$$v_{H2O2}=2\times\Delta O_2 \quad (6)$$

このカタラーゼ有無の差をとる方法は，光合成の電子供与体が $H_2O$ で $O_2$ が発生する場合でも，それ以外の場合でも同じように適用できる．インタクト葉緑体では，酸化的ストレスによってアスコルビン酸ペルオキシダーゼが失活したとき，葉緑体外に $H_2O_2$ が放出される速度を測定することができる[30]．

### 1.d.3.4　PSII 反応中心標品での $^1O_2$ 生成（His/RNO 法）

$^1O_2$ が生成し，His（またはイミダゾール）が存在すると，両者はペルオキシド中間体［$HisO_2$］を形成し，最終的に安定な酸素付加物 $HisO_2$ となる．すなわち His 依存 $O_2$ 消費は $^1O_2$ 生成の指標となる．

$$^1O_2+His\rightarrow[HisO_2]\rightarrow HisO_2 \quad (7)$$

また，［$HisO_2$］は *p*-nitrosodimethylaniline（RNO）を酸化し，脱色する（$\lambda_{max}$：440 nm）．これを分光学的に追跡することができる．

$$[HisO_2]+RNO\rightarrow RNO_2+生成物 \quad (8)$$

測定にはクロスイルミネーションのできる分光光度計を用い，検出器には干渉フィルターで 440 nm の光のみを透過させ，試料の照射には 440 nm より長波長側の光を用いる．

$^1O_2$ の寿命はアジ化物イオン（$N_3^-$）で短くなり，重水（$D_2O$）中で長くなる（つまり $^1O_2$ の定常濃度が高くなる）ことを利用し，コントロール実験として，上の 2 つの反応が，(i) アジ化物イオンにより抑制され，(ii) $D_2O$ 溶媒中で促進されることを確認する．この検出法により，Telfer らは，エンドウマメ PSII 反応中心に光照射したとき $^1O_2$ が生成することを示した[7]．

### 1.d.3.5　PSII 膜標品での過酸化脂質生成

感度の高い過酸化脂質検出試薬として，ペリレン環にトリフェニルホスフィンを結合させたジフェニル-1-ピレニルホスフィン（DPPP）が用いられてきた．ホスフィンが過酸化物と反応して生成するホスフィンオキシドが強い蛍光をもつ．最近開発された Spy-LHP は，DPPP に長鎖アルキルを結合させ親油性を高めており，$H_2O_2$ および他の活性酸素種との反応性が極めて低く，過酸化脂質にほぼ特異的である[31]．励起・発光波長域が 500〜550 nm であること，nM レベルの検出感度をもち少量の試料で測定できることからクロロフィルによる消光を低く抑えることができ，植物試料に適している．検量線作成の標準過酸化物には *m*-chloroperbenzoic acid を用いる．水溶性の過酸化脂質標準物としてよく用いられる *tert*-butyl hydroperoxide や cumene hydroperoxide は Spy-LHP との反応性が低く，本法の標準物としては不適である．

**［実験方法］**[32]

1．用意するもの

(1) Spy-LHP ストック溶液．Spy-LHP（同仁化学，S 343）をアセトンに溶解し，1 mM 溶液とする．ガラス容器中，窒素雰囲気下，−20°C で保存できる．酸素存在下では次第に酸化される[31]．

(2) Spy-LHP 測定溶液（用時調製）．上記ストック溶液をエタノールで希釈し，2.7 $\mu$M とする．一測定あたり 2.7 ml 使用する．

(3) 標準 LOOH．*m*-chloroperbenzoic acid のエタノール溶液（25 nM〜250 nM）を調製する．

2．PSII 膜標品を 50 mM Mes-NaOH，pH 6.0，35 mM NaCl に懸濁し（50 μg Chl/ml），光照射する．経時的に 0.3 ml を取り，Spy-LHP 測定溶液 2.7 ml と混合する．(Chl 終濃度 5 μg/ml となる．25 μg/ml まで上げてもよい)

3．暗所で 30 分間静置した後，膜画分を遠心(18,000×*g*，5 分)により除き，上清を得る．上清中の蛍光体は暗所で数時間安定である．

4．励起光 524 nm での 535〜537 nm の蛍光を測定する．

5．検量線および消光補正は次のように得る．標準 LOOH（各濃度）に，PSII 膜標品を加えたもの（＋PSII）と加えないもの（－PSII）を調製する．光照射せず，Spy-LHP 測定溶液と混合，静置，遠心し，上清を得る．＋PSII，－PSII 試料それぞれの標準 LOOH 濃度ゼロでの蛍光強度を $a_1$，$a_2$，それぞれの検量線の傾きを $b_1$，$b_2$ とする．クエンチング係数は $b_1/b_2$ であり，光照射後の試料の蛍光強度 x が得られたなら，それに対応する過酸化脂質濃度は $(x-a_1)\times b_2/b_1$ となる．また光照射前の PSII 膜に含まれる LOOH 濃度は，$(a_1-a_2)\times b_2/b_1$ となる．

## 1.d.4　組織抽出液の過酸化物・酸化生成物測定

### 1.d.4.1　組織からの抽出に関する諸注意

組織から抽出して測定できるのは，比較的安定な物質であり，活性酸素としては $H_2O_2$ や LOOH などの過酸化物に限られる．また，細胞内活性酸素生成の間接的な指標として，過酸化脂質が分解して生じるアルデヒドや，酸化タンパク質など，活性酸素による酸化生成物の増大，および抗酸化物である AsA や GSH の酸化，減少も測定できる．これらの物質も充分安定ではなく，また酸化還元を受けやすいため，組織からの抽出に際してはつぎのような注意が必要である．

(1)　分析物の安定性．過酸化物は－80°Cで保存していてもしだいに分解する．試料調製後はなるべく早く抽出し測定する必要がある．アルデヒドは比較的安定だが，過酸化脂質の分解で次第に生成するため，植物材料を長期間凍結保存することは望ましくない．AsA，グルタチオン測定の試料は凍結保存せず，フレッシュな植物材料から測定試料を当日抽出し，測定する．

(2)　抽出操作に伴うアーテファクト．組織の磨砕により鉄イオン等が結合タンパク質から遊離すると，還元剤が鉄イオン等で容易に酸化され減少すると同時に，還元された鉄イオンが $O_2$ を還元し $O_2^{\cdot-}$ を生成することで $H_2O_2$，$HO^{\cdot}$，有機ラジカル生成の原因となる．キレート剤の添加が不可欠である．アルデヒド抽出の際は，過酸化脂質の生成を防ぐため還元剤を加える．

(3)　検量線の作成．試料からの分析物の回収率を見積もるため，量の異なる標準化合物を試料に加え，検量線を作成する．

### 1.d.4.2　過酸化水素，有機ペルオキシドの測定

$H_2O_2$ と二価鉄イオンにより生成した $HO^{\cdot}$ とキシレノールオレンジによる発色を定量する FOX アッセイ，ペルオキシダーゼ反応による酸化生成物の蛍光（ホモバニリン酸）や発光（ルミノール）を測定する方法がある．いずれの測定でも $H_2O_2$ だけでなく有機ペルオキシド（LOOH，ROOH）も検出される．有機ペルオキシド由来のシグナルを見積もるために，カタラーゼを加え $H_2O_2$ のみを消去した試料で同じ測定を行う．Queval らは $H_2O_2$ の抽出・検出条件を詳細に検討し，次のような注意事項を挙げている[33]．

(1)　抽出：酸で抽出，中和し塩を除く．低温ですばやく行う．試料量と抽出液量の比を一定にする．

(2)　抽出後の処理：AsA をアスコルビン酸酸化酵素（AOX）で酸化し除去する（AsA 除去は Cheeseman の推奨する脱気処理[34]に代わるもので，より優れている）．イオン交換樹脂でフェノール類を除く．カタラーゼ処理したネガティブコントロールを作る．

(3)　アッセイ法と定量：蛍光またはルミネセンス測定が高感度である．内部標準を加えたコントロール試料を作成する．

(4)　その他コントロール実験：抽出液の体積と測定値の直線的相関性を確認．抽出および試料調製時の $H_2O_2$ 収率を確認．

ここでは，シロイヌナズナ葉からの $H_2O_2$ 抽出と測定例[33,34]を紹介する．ルミノール化学発光法の方が FOX 法より感度が高いが，分光光度計で測定する後者の方が汎用性が高いため，FOX 法を例示した．

[実験方法]

1．用意する試薬

(1)　0.2 M 塩酸．

(2)　0.2 M NaOH．

(3)　AOX．

(4)　カタラーゼ．

(5)　FOX 指示薬（X 2）．0.5 mM 硫酸アンモニウム第

一鉄，0.2 mM キシレノールオレンジ，0.2 mM ソルビトール，2％（v/v）エタノール，50 mM 硫酸

(6) $H_2O_2$ 標準液（1.0，2.0，5.0 $\mu$M）．240 nm での分子吸光係数 $\varepsilon = 43.6\ M^{-1}s^{-1}$ を用いる．

2．葉 100 mg を液体窒素凍結下で磨砕し，さらに 0.2 M 塩酸 20 ml を加え磨砕する．

3．遠心上清 5 ml をとり，50 mM $Na_2HPO_4$ 水溶液 40 ml を加え，0.2 M NaOH で pH 5 に調整し，体積を 50 ml にする．

4．0.5 ml をとり，AOX を 2 U $ml^{-1}$ となるよう加え，5 分間インキュベートする．

5．AOX 処理後の試料を 2 つに分け，一方にカタラーゼを 25 U $ml^{-1}$ となるよう加え，5 分間インキュベートする．

6．試料液（(＋) カタラーゼまたは（－）カタラーゼ）100 $\mu$l，FOX 指示薬(X 2)0.5 ml，蒸留水 0.4 ml を混合する．

7．5 分以上おいてから，$A_{550}-A_{800}$ を測定する．

8．検量線は，各濃度の $H_2O_2$ 標準液 100 $\mu$l に FOX 指示薬(X 2)0.5 ml，蒸留水 0.4 ml を加え，作成する．

9．検量線から試料の過酸化物濃度を求める．カタラーゼ添加試料で得られる値は LOOH に由来すると見なせるので，試料の $H_2O_2$ 含量は（カタラーゼ不添加）－（カタラーゼ添加）の値から求める．

### 1.d.4.3 過酸化脂質分解物（チオバルビツール酸反応物 TBARS）測定[35]

過酸化脂質の非酵素的分解産物であるマロンジアルデヒド $HOCCH_2CHO$（MDA）などのアルデヒドとチオバルビツール酸（TBA）を酸性条件で反応させ，生成する赤色の色素（チオバルビツール酸反応物；TBARS）を分光学的に定量する．過酸化脂質生成の指標として広く用いられている．アルデヒドは比較的安定であり，抽出前の植物試料は－80℃で数日間保存できる．一測定に試料 0.5 g 程度を用いる．試料に含まれるアントシアニンなど色素の影響を除くために，TBA を含まない溶液で同じ処理を行った試料との差をとる．TBARS には MDA 以外のアルデヒド反応物も含まれるため，MDA を用いた検量線から計算した値を「MDA 当量」と表わす．

[実験方法]

1．用意するもの

(1) 抽出溶液．エタノール：水，80：20 (v/v)

(2) TBA(－)液．20％ トリクロロ酢酸，0.01％ ブチルヒドロキシトルエン（BHT）

(3) TBA(＋)液．上の TBA(－)液にチオバルビツール酸を 0.65％（w/v）溶解する．

2．試料 0.5 g を乳鉢に入れ，抽出溶液 10 ml と海砂を加えよく磨砕する．

3．室温で 20 分静置した後，遠心分離(3,000×$g$，10 分)する．

4．ふた付遠心管 2 本を用意し，一方には上清 1 ml と TBA(－)液 1 ml を混合する．もう一方には上清 1 ml と TBA(＋)液 1 ml を混合する．どちらも激しく振とうし，沸騰湯浴中で 25 分間加熱する．

5．試料を冷まし(室温で 5 分，氷中で 5 分)，遠心分離（3,000×$g$，10 分）し，上清を得る．

440 nm，532 nm，600 nm の吸光度を測定し(TBA(－)は 440 mm の測定不要)，以下の計算式から MDA 当量を求める．

$$A_{532}(TBA(+))-A_{600}(TBA(+))-\{A_{532}(TBA(-))-A_{600}(TBA(-))\}=X \quad (9)$$

$$\{A_{440}(TBA(+))-A_{600}(TBA(+))\}\times 0.0571=Y \quad (10)$$

$$MDA\ 当量(nmol\ ml^{-1})=\{(X-Y)/157,000\}\times 10^6 \quad (11)$$

### 1.d.4.4 酸化タンパク質（カルボニル化タンパク質）測定[36]

タンパク質のアミノ酸残基のうち，Cys，Met，His，Trp，Tyr，Lys，Arg，Pro は活性酸素によって酸化されやすい．このうち Lys，Arg，Pro の酸化でカルボニル基が生じる[37]．また，Lys への MDA 付加や Cys，His へのアクロレイン（脂質由来アルデヒドのひとつ）付加によってもカルボニル基が生じる[38]．これに 2,4-dinitrophenylhydrazine(DNPH)を反応させ(DNP 化)，発色させて定量する．一測定に試料 1 g 程度が必要で，試料調製から 1 日以内で終了する．実験例を下に紹介する．

この DNP 化タンパク試料の電気泳動を行い，抗 DNP モノクローナル抗体を一次抗体としたイムノブロッティングによって修飾タンパクのバンドを特定すれば，ペプチドシークエンシングからカルボニル化タンパク質が同定できる．また，MDA などアルデヒド修飾タンパク質に対する抗体がいくつか市販されている（日油㈱，東京）．Yamauchi ら[39]は，抗 MDA 修飾タンパク抗体を用い，高温ストレス処理を行ったシロイヌナズナ，ホウレンソウでは，それぞれ OEC33 および LHCII が優先的に MDA 修飾を受けることを明らかにしている．

[実験方法]

1．用意する試薬

(1) 抽出メディウム．10 mM リン酸ナトリウムバッファー，pH 7.4，1 mM EDTA，2 mM DTT，0.2％

(v/v) Triton X-100, 1 mM phenylmethane sulfonyl fluoride (PMSF)

(2) 10 mM DNPH 溶液 (2 M 塩酸中)

2．洗った葉 1 g を乳鉢に入れ，4 ml の抽出メディウムと少量の海砂を加え，磨砕し，ミラクロス (Calbiochem) 一層でろ過後，遠心分離し (27,000×$g$，20 分)，上清を得る．これを試料とする．

3．タンパク濃度を測定しておく．一測定あたり少なくとも 0.5 mg タンパク質を用いる．

4．核酸を除くため，試料に 1％(w/v) 硫酸ストレプトマイシンを加え，20 分間静置し，遠心分離する (2,000×$g$，5 分)．

5．上清 (200 $\mu$L) に 10 mM DNPH 溶液 300 $\mu$L を加え，混合する．ブランク試料には 2 M 塩酸を同量加える．室温で 1 時間静置する．

6．トリクロロ酢酸を 10%となるよう加え，遠心し，沈殿したタンパク質を 500 $\mu$L エタノール／酢酸エチル (1：1) で 3 回洗浄する．

7．沈殿を 6 M グアニジン塩酸，20 mM リン酸カリウムバッファー，pH 2.3 に溶解する．

8．$A_{370}$ からカルボニル含量を求め ($\varepsilon$＝22.0 $mM^{-1}$ $cm^{-1}$)，mg タンパク質あたりのカルボニル含量を計算する．

### 1.d.4.5 $^1O_2$ により特異的に生成する過酸化脂質の検出[40)]

リノール酸やリノレン酸など多価不飽和脂肪酸は酸化を受け，過酸化脂質となる．不飽和脂肪酸のペンタジエニル構造 (−CH＝CH−$CH_2$−CH＝CH−) に対し，$^1O_2$ は不飽和結合をつくる 2 つの C 原子にエンドペルオキシドの形で付加し，結果として 4 種のヒドロペルオキシド (R-OOH) が生じる．一方，$HO^{\cdot}$ などラジカルによる酸化では，中央の C 原子の水素引き抜きが優先的に起こり，ペンタジエニル構造の両端の C 原子にしか $O_2$ は付加しないため，2 種類のヒドロペルオキシドしか生成しない．中央の C 原子の隣の C 原子に-OOH をもつ過酸化脂質は $^1O_2$ 付加反応でのみ生成するので $^1O_2$ マーカーとなる (図 3)[41)]．リノレン酸の過酸化物では，10-hydroperoxy-8, 12, 15 (*E*,*Z*,*Z*) octadecatrienoic acid, 15-hydroperoxy-9, 12, 16 (*Z*,*Z*,*E*) octadecatrienoic acid の 2 つである．組織から脂質画分を抽出し，過酸化物をアルコールに還元し安定化させてから，LC/MS/MS で分離・定量する．このとき，ラジカル反応で生成する他の LOOH アイソマーも定量し，$^1O_2$ 付加反応とラジカル酸化反応の比を求める．Triantaphylidès ら[40)] はこの方法で，さまざまな酸化的ストレスを与えたとき葉で $^1O_2$ が生成することを示した．

### 1.d.4.6 アスコルビン酸 (AsA)，グルタチオンの含量および酸化還元レベルの測定

AsA とグルタチオンは植物における主要な抗酸化物であり，組織中に mM レベルで含まれる．生細胞ではほぼ 9 割が還元型，1 割が酸化型であり，これらの中間の酸化状態にあるラジカル分子 (微量) との三者間で化学

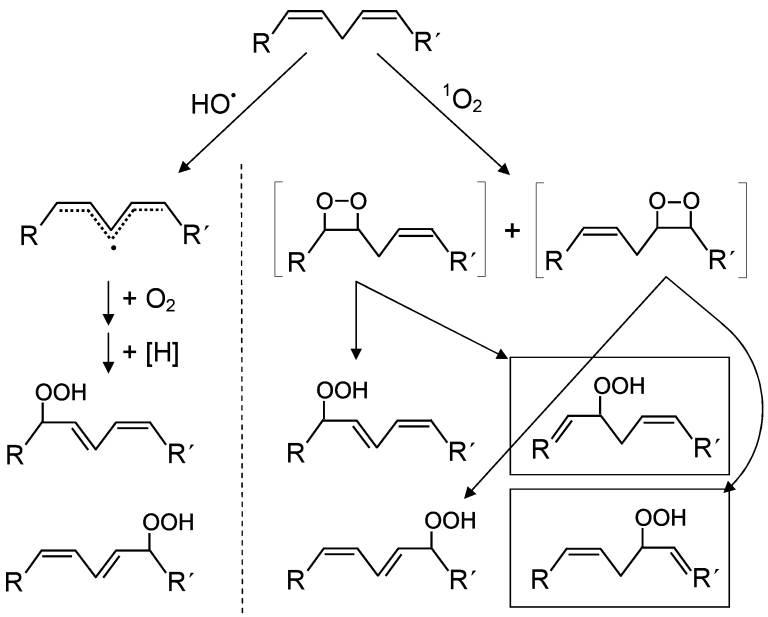



**図 3**：多価不飽和脂肪酸と活性酸素の反応で生成する過酸化脂質．左の経路は $HO^{\cdot}$, $HO_2^{\cdot}$ などラジカルによる酸化，右の経路は $^1O_2$ の直接付加反応．枠で囲んだ分子種が $^1O_2$ 付加反応のマーカーとなる．

平衡が成立している．還元型・酸化型の比率，および両者の合計量は，植物が受ける酸化ストレスの種類・程度によってダイナミックに変化するだけでなく，抗酸化物の生合成・分解速度にも影響される．組織中の抗酸化物の酸化還元比率を変化させず，かつ高効率で抽出し，測定するには，いくつか注意が必要である．(1) 抗酸化物は，溶存酸素による酸化（自動酸化）を受ける．例えばAsA は $Fe^{2+}/Fe^{3+}$ など遷移金属イオンの共存下で容易にデヒドロアスコルビン酸(DHA)に酸化される．DHA は不安定で分解しやすい．(2) 共存する抗酸化物どうしの酸化還元反応が起こる．たとえばDHA は還元型グルタチオン(GSH)と酵素的または非酵素的に反応し，AsA と酸化型グルタチオン(GSSG)を生じる．これらの反応は特に pH が高い領域で速いため，動･植物･微生物材料を問わず，抗酸化物の抽出には通常氷冷した強酸性溶液(トリクロロ酢酸，メタリン酸，過塩素酸，スルホサリチル酸等)を用いる．試料等の制約で中性付近の pH での抽出が必要なときは，自動酸化を防ぐため 1〜5 mM 程度の EDTA を添加する．また，試料は抽出したその日のうちに全て測定する．

一般に抗酸化物の測定では酸化型・還元型のいずれか一方を検出する．抽出液中の酸化型と還元型の総量を求めるには，全てを酸化または還元した後に測定を行って総量を求め，別に同じ試料を用いて酸化型・還元型の片方を化学的にマスクし，残った一方のみを測定する．両者の差から酸化型と還元型の量を求める．これらの前処理に用いるジチオスレイトール (DTT) や *N*－エチルマレイミド (NEM) は，測定前に除去する必要があり，操作の煩雑さ，工程の多さから微量定量ではしばしば誤差の要因となる．近年，測定に影響しない新規試薬の使用(例えばDHA の還元剤としてのトリス[2-カルボキシエチル] フォスフィン)[42]，総量からではなく還元体･酸化体をそれぞれ直接測定する方法などが開発され，これらの問題は徐々に解消されつつある．

### 1.d.4.6.1 アスコルビン酸（AsA）とデヒドロアスコルビン酸（DHA）

活性酸素によりAsA が Asc· ラジカルに酸化され，不均化反応でDHA が生じる(後述 1.d.5.1)．DHA は酵素によりAsA へ還元再生されるが，AsA 酸化速度がDHA 還元速度を上回れば AsA/DHA 比が低下する．また，DHA は分解しやすいため，DHA の蓄積は[AsA＋DHA] プール全体の量の低下につながる．

従来，AsA の測定は，ジクロロインドフェノールや活性炭で AsA を酸化させ，生成したDHA をスズ･メタリン酸存在下でジニトロフェニルヒドラジンと反応させてオサゾンに変換し HPLC で分析する方法が行われてきた．この方法は感度および特異性に優れており，食品成分表に記載のビタミンC 含量は基本的にこの方法に依っているが，操作が煩雑で時間がかかる．ここでは最近適用例が増えてきた，α,α′-ジピリジルを用いる方法[43]と，DHA を直接測定する酵素法[44]を紹介する．一測定あたり 1 g 程度の試料が必要である．AsA は凍結試料中でも酸化されるため，試料を採取したその日のうちに抽出・定量する必要がある．

#### 1.d.4.6.1.1 ジピリジル法

α,α′-ジピリジルは $Fe^{2+}$ と反応して 525 nm 付近にピークを持つ赤色の化合物を生成する．AsA は酸性条件下でも $Fe^{3+}$ をよく還元することから，この性質を用いて AsA が測定できる．本法は他の抗酸化物の影響を若干受けるものの，比較的短時間に測定を完了できる．

[実験方法]

1．用意する試薬

(1) 6％トリクロロ酢酸（抽出用）．冷蔵保存可
(2) 10%トリクロロ酢酸．冷蔵保存可
(3) 0.2 M リン酸ナトリウム緩衝液(pH 7.4)．常温保存可
(4) 10 mM DTT ((2)に溶解させる)．用時調製
(5) 0.5% NEM．用時調製
(6) 42% (w/w) リン酸．常温保存可
(7) 4% α,α′-ジピリジル（和光純薬）．70%エタノールに溶解させる．冷蔵保存可
(8) 3％ $FeCl_3$．冷蔵保存可
(9) AsA 標準液(検量線用，0〜1.0 mM)．6％トリクロロ酢酸に溶解させる．用時調製

2．植物組織からの抽出

(1) 切り取った組織 0.4〜1.2 g（洗った場合は表面の水をペーパータオルなどでよく拭き取る）を計量 (g 新鮮重あたりで AsA 量を求める場合)し，液体窒素で予め冷却した乳鉢に入れる．
(2) 液体窒素を加え，乳棒で粉末になるまですり潰す．液体窒素が完全に気化する前に，氷冷した 6％ TCA 0.8 ml を加え，溶解と同時に TCA が試料に浸潤するように，乳棒で擦ってこれを溶かす（液体窒素が蒸発してしまうと，粉砕した試料の AsA が空気に触れ，低温でも酸化されてしまう．その前に酸性にしてしまうことが重要である．TCA を加えたとき，凍るくらいの方がよい)．乳鉢･乳棒の表面を 6％　TCA で洗いながら抽出液を集め，全容を 2 ml に調整する．多検体の抽出を行うときは，一検体

の抽出が終わってから次の試料の採取を行う．フェオフィチンあたりのアスコルビン酸量を求める場合は，この抽出液から一部を取ってフェオフィチン定量に用いる．

(3) 抽出液を10,000×$g$，4℃，10分間遠心し，上清を新たな試験管に移す．これを測定試料とする．

3．表3に従い，新たな試験管に，試料，試薬を1)〜10)の順に混合していく．

4．すべてを加えた後，42℃恒温槽で40分間加温する．

5．$A_{525}$を測定し，(本試験)−(盲検)の値から検量線によりAsA濃度を求める．

### 1.d.4.6.1.2 アスコルビン酸オキシダーゼ（AOX）・デヒドロアスコルビン酸レダクターゼ法

AsAの紫外吸収は，DHAに酸化されると消失する．AsAの$O_2$による酸化を触媒するアスコルビン酸オキシダーゼ(AOX)を加えAsAをDHAに酸化し，吸光度減少からAsA濃度を測定することができる．

$$2AsA + O_2 \rightarrow 2DHA + 2H_2O\ (A_{265}\downarrow) \qquad (12)$$

DHAは，GSHによるDHAからAsAへの還元を触媒するDHAレダクターゼを用い，AsA生成として定量する方法を筆者らが最近開発した[44]．

$$DHA + 2GSH \rightarrow AsA + GSSG\ (A_{265}\uparrow) \qquad (13)$$

AsAとDHAの測定値から，酸化型と還元型の比を求める．この方法は酵素を用いるため特異性が高い．また，DHAレダクターゼ法は，従来のDHA定量法（DTTでDHAをAsAに還元，総アスコルビン酸量を求め，(総アスコルビン酸)−(AsA）をDHA量とする）に比べ，精度が改善されている．

[実験方法]

1．用意する試薬

(1) 6％ トリクロロ酢酸（TCA）（抽出用）．

(2) 0.2 M リン酸カリウム緩衝液（pH 7.4），1 mM EDTA．

(3) 0.1 M リン酸カリウム緩衝液（pH 6.0），1 mM EDTA．

(4) 200 mM GSH．

(5) AOX（東洋紡，0.1 U/$\mu$l）．
0.5 mM AsA，0.5 mM EDTA，5 mM リン酸ナトリウム（pH 5.6）混合液中で$A_{265}$の減少（$\varepsilon$＝14.0 $mM^{-1}cm^{-1}$）から求め，1分間に1 $\mu$molのAsAを酸化する酵素量を1 Uとする．

(6) DHAレダクターゼ(組換え体，イネ由来，0.2 U/$\mu$l)[44]．
0.1 mM DHA，2 mM GSH，50 mM リン酸カリウム（pH 7.8）混合液中で$A_{265}$の増大から求め，1分間に1 $\mu$molのAsAを生成する酵素量を1 Uとする．この酵素量検定に用いるDHAはAsAから以下のように用時調製する(ドラフト内で行う)．ミリQ水に溶解させた100 mM AsA水溶液に等容の臭素水(3％w/v)を加えて混合した後，窒素ガスを2分程度吹き込み過剰な臭素を追い出す．これを6％TCAで希釈し10 mMとする．市販のDHA標品は純度が低く，正確な濃度が決められない．

AOXおよびDHAレダクターゼは，1 mg/ml以上の濃度で0.1 Mリン酸カリウム緩衝液（pH 6.0），1 mM EDTAに溶解させたものを100 $\mu$l程度ずつマイクロチューブに入れ，−20℃で保存する．AsA測定時に活性を検定する．数回の凍結融解は実用上問題な

**表3**：ジピリジル法の測定液調製法．「−」は，加えないことを示す．単位はml．

| | AsA（還元型）量 | | 総アスコルビン酸量 | |
|---|---|---|---|---|
| | 本試験 | 盲検 | 本試験 | 盲検 |
| 1）測定試料／標準液 | 0.2 | − | 0.2 | − |
| 2）10 mM DTT | − | − | 0.2 | 0.2 |
| 3）6％ TCA | − | 0.2 | − | 0.2 |
| 4）0.2 M リン酸緩衝液 | 0.6 | 0.6 | 0.4 | 0.4 |
| 混合後，42℃恒温槽で15分加温する． | | | | |
| 5）0.5% NEM | − | − | 0.2 | 0.2 |
| 混合後，1分間室温におく． | | | | |
| 6）ミリQ水 | 0.2 | 0.2 | − | − |
| 7）10% TCA | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 |
| 8）42% リン酸 | 0.8 | 0.8 | 0.8 | 0.8 |
| 9）4％ $\alpha,\alpha'$-ジピリジル | 0.8 | 0.8 | 0.8 | 0.8 |
| 10）3％ $FeCl_3$ | 0.4 | 0.4 | 0.4 | 0.4 |
| $FeCl_3$を加えたら速やかにボルテックスミキサーで混合する． | | | | |
| 合計 | 4.0 | 4.0 | 4.0 | 4.0 |

い．

2．組織からの抽出．1 d.4.6.1.1 の 2．と同じ．

3．AsA の測定．

⑴ 10〜100 μl の粗抽出液をキュベットに入れ，3 倍体積の 0.2 M リン酸カリウム緩衝液（pH 7.4），1 mM EDTA を加え，中和する．

⑵ ここに，全容が 999 μl になるよう 0.1 M リン酸カリウム緩衝液（pH 6.0），1 mM EDTA を加え，$A_{265}$ を測定する．

⑶ 1 μl の AOX を加えて，5 分放置後，$A_{265}$ を測定する．

⑷ AOX 添加による吸光度減少から，測定溶液中の AsA 濃度を求める（$\varepsilon_{265}$＝14.0 $mM^{-1}cm^{-1}$）．

4．DHA の測定（※）．

⑴ 上の 3.⑴と同様の操作によりキュベット内で粗抽出液を中和する．

⑵ ここに，全容が 989 μl になるように 0.1 M リン酸カリウム緩衝液（pH 6.0），1 mM EDTA を加え，$A_{265}$ を測定する．

⑶ 1 μl の DHA レダクターゼ，次いで 10 μl の 200 mM GSH を加え，5 分後，$A_{265}$ を測定する．

⑷ DHA レダクターゼ反応により増大した吸光度に対応する AsA 濃度が，測定溶液中に存在していた DHA の濃度である．

※ DHA は試料中の GSH によって非酵素的に還元され減少する可能性がある．非酵素的反応の速度定数は pH が低いほど小さいので，本法では DHA レダクターゼの至適 pH である pH 7.8〜8 ではなく pH 6 の緩衝液を用いる．pH 8 と pH 6 では，GSH と DHA の非酵素的反応の速度定数は 2 桁以上小さくなるのに対し，DHA レダクターゼ活性は約半分の低下にとどまる．これにより非酵素的 DHA 還元を実質的に抑えることができる．DHA レダクターゼは，至適 pH で校正した酵素量から計算される必要量の 2 倍を用いている．

### 1.d.4.6.2 グルタチオン還元型（GSH），酸化型（GSSG）

GSH は AsA とほぼ同じ安定性，測定感度であり，同様の制約がある．グルタチオンレダクターゼ（GR）とジチオビスニトロ安息香酸（DTNB）を用いた酵素リサイクリング法が第一選択であり，この方法を紹介する．試料調製から測定終了まで半日以内である．

本法では，GSSG が GR によって GSH に還元される反応と，GSH による DTNB の還元反応をカップルさせ，DTNB の還元生成物である 5-メルカプト-2-安息香酸の吸収増大（$\lambda_{max}$＝412 nm）を計測する（図 4）．充分量の NADPH と DTNB が存在し，かつ，反応液中の GSSG 濃度が GR の GSSG に対する Km 値に対して低い条件では，GR の GSSG 還元反応が全過程の律速段階となり，吸光度は添加したグルタチオン濃度，および反応時間に比例して増加する．

GSH と GSSG を分別するには，チオール基と不可逆的に結合する試薬を試料に加え GSH をマスクし，過剰量のマスキング剤を除去してから，試料中に残る GSSG を上の測定で求める．紹介する方法[45]は，抽出にスルホサリチル酸，チオールのマスキングに 2-ビニルピジリンを用いるもので，従来法（トリクロロ酢酸抽出，NEM によるマスキングの後，エーテル抽出を繰返す）に比べ簡略で，回収率のばらつきとスループットが改善されている．なお，本法は試料中の他のチオールの影響を受けるが，組織内の代謝物濃度や酵素の基質特異性を考慮すると，おおよそ問題のないレベルで測定が可能であり，筆者らはこの方法で植物・酵母の抽出液中のグルタチオン量を良好に測定している．GSH をそれ以外のチオール

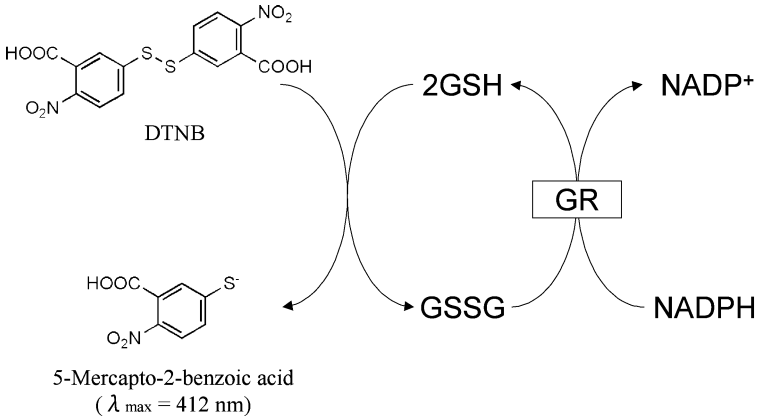



図 4：グルタチオンの酵素リサイクリング反応の原理．

化合物と分別して精密定量するHPLC分析法も確立されている[46]．

[実験方法]

1．用意する試薬
⑴　4％スルホサリチル酸（抽出用）．
⑵　0.1 Mリン酸カリウム緩衝液（pH 7.5），1 mM EDTA．
⑶　50 mM GSSG．4％スルホサリチル酸，0.1 Mリン酸カリウム緩衝液（pH 7.5），1 mM EDTAに溶解させる．
⑷　50 mM NADPH．4％スルホサリチル酸，0.1 Mリン酸カリウム緩衝液(pH 7.5)，1 mM EDTAに溶解させる．用時調製．
⑸　1 mM DTNB(10 mM溶液は－20℃で少なくとも1ヶ月は安定に保存できる．実験当日に10倍希釈し使用する)
⑹　97％2-ビニルピリジン．
⑺　20％トリエタノールアミン．
⑻　グルタチオンレダクターゼ(GR：オリエンタル酵母，1 U/$\mu$lの液状品)．
2．組織から抽出液を調製する．操作は1 f.3.4.1.1の2.～4.に準じる．ただし抽出液には4％スルホサリチル酸を用いる．
3．50 mM GSSG 6 $\mu$lを4％スルホサリチル酸994 $\mu$lと混合する（終濃度300 $\mu$M）．さらにこれを4％スルホサリチル酸で段階的に希釈し，150，75，37.5，18.8，9.38，4.68 $\mu$Mおよび0のGSSG標準液を調製する．

〈総グルタチオン濃度（GSH＋1/2×GSSG）の測定〉
4．2.で調製した抽出液または3.で調製したGSSG標準液4 $\mu$lをマイクロタイタープレートのウェルに入れる．
5．196 $\mu$lの0.1 M　リン酸カリウム緩衝液（pH 7.5），1 mM EDTAを4.のウェルに加えて混合する．
6．5.の混合液を50 $\mu$l×3連とって，別のウェルに移す．
7．別の容器で2.8 mlの1 mM DTNB，3.75 mlの1 mM NADPH，5.85 mlの0.1 Mリン酸カリウム緩衝液(pH 7.5)，1 mM EDTA，および4 UのGRを混合し，リザーバーに移す．これをマルチチャンネルピペッターで100 $\mu$lずつ，6.のウェルに加える．記載した量で96穴プレート1枚分のウェルに試料を添加できる．
8．プレートミキサーでウェル内の溶液を混合し，マイクロプレートリーダーで$A_{412}$を測定する．
9．10～30分後にもう一度$A_{412}$を測定する．インターバル時間は試料の呈色程度に応じて任意に決定してよい．
10．9.と8.の吸光度の差を，GSSG標準液の濃度に対してプロットし，比例関係が保持されている濃度範囲を用いて検量線を作成する．複数時間で測定することにより，試料測定に適した濃度の検量線が得られる．

〈1/2×GSSG濃度の決定〉
11．2.で調製した抽出液，および3.で調製したGSSG標準液を260 $\mu$lずつ別々のマイクロチューブにとる．それぞれに2-ビニルピリジン10 $\mu$lを加え，30秒間ボルテックスミキサーの最高速で撹拌する．次いで20％トリエタノールアミンを80 $\mu$l加え，同様に撹拌する．
12．室温で10,000 rpm，1分間遠心分離する．
13．下層を50 $\mu$l×3連とって，マイクロタイタープレートのウェルに分注する．このとき2-ビニルピリジンの油滴を取らないように注意する．
14．〈総グルタチオン濃度（GSH＋1/2×GSSG）の決定〉の7.～10.と同様，グルタチオン濃度を求める．
15．（総グルタチオン濃度）－（1/2×GSSG濃度）から，もとの試料のGSH濃度を求める．

## 1.d.5　活性酸素のin situ（in vivo）測定

生きた組織や植物体では恒常的に活性酸素種が生成しているが，そのほとんどは，細胞の抗酸化成分によって消去されており，細胞での活性酸素種の定常濃度は数$\mu$M以下（分子種による）である．in situ測定では抗酸化物やプローブ試薬が活性酸素種と反応して生じる酸化生成物を検出する．

### 1.d.5.1　葉切片のアスコルビン酸ラジカル測定[47]

AsAは植物細胞に数十mM含まれ，アスコルビン酸ペルオキシダーゼの電子供与体として$H_2O_2$を還元し，自身はAsc·に酸化される．

$$H_2O_2 + 2AsA \rightarrow 2H_2O + 2Asc^{\cdot} \qquad (14)$$

またAsAは非酵素的に水溶性のラジカル種（R·）を一電子還元・消去し，この反応でもAsc·ラジカルが生成する．

$$R^{\cdot} + AsA \rightarrow RH + Asc^{\cdot} \qquad (15)$$

すなわちAsc·は活性酸素種の包括的マーカーと見な

すことができる．

細胞には Asc˙ ラジカルを特異的に還元する酵素系がある．ストロマでは Asc˙ ラジカルは還元型フェレドキシン（$Fd_{red}$）によって速やかに還元される[27]．NAD (P) H を電子供与体とするモノデヒドロアスコルビン酸レダクターゼ（MDAR）もストロマ，ミトコンドリア，ペルオキシソームに存在する．

$$Asc^{\cdot} + e^{-} + H^{+} \rightarrow AsA \qquad (16)$$

これらによって還元されない場合，Asc˙ ラジカルは，自己不均化で AsA と DHA になる．

$$Asc^{\cdot} + Asc^{\cdot} + 2H^{+} \rightarrow AsA + DHA \qquad (17)$$

活性酸素種が生成する条件で細胞内コンパートメントの Asc˙ ラジカルの定常濃度 $[Asc^{\cdot}]_{st}$ は，上記の反応のバランスによって決まる．AsA 酸化による Asc˙ ラジカル生成速度を $v_P$，Asc˙ ラジカルの還元速度と不均化速度をそれぞれ $v_R$，$v_D$ とすると，定常状態では

$$v_P = v_R + v_D \qquad (18)$$

となり，$v_R = k_R[Asc^{\cdot}]_{st}$，$v_D = k_D[Asc^{\cdot}]_{st}^2$（反応速度定数 $k_R$ は $Fd_{red}$ 濃度，MDAR 濃度，NADPH 濃度に依存．$k_D$ は pH に依存）である．すなわち，活性酸素種による AsA 酸化が増大すると（$k_R$，$k_D$ が一定として）Asc˙ ラジカルの定常濃度が増大する．また酵素の失活などにより Asc˙ ラジカル還元速度が低下しても $[Asc^{\cdot}]_{st}$ は増大する．葉の切片を ESR キャビティ内にセットし，Asc˙ ラジカルを測定することで，細胞内のこうした状況を観測することができる．Asc˙ ラジカルの細胞内での寿命はミリ秒レベル以下であり，ESR で検出するシグナル強度は Asc˙ ラジカルの定常濃度に対応する．ただし，肉厚の葉，毛状突起のある葉，平らにできない葉（シロイヌナズナ，タバコ，セントポーリアなど）は本法には不向きである．これは水によってマイクロ波が吸収されたり，不規則な形状によって ESR キャビティ内のマイクロ波共鳴が乱されるためである．

**[実験方法]**

1．用意するもの
- (1) 石英製ティシュセル
- (2) メチルビオローゲン 0.1 mM

2．植物の生葉を 4 mm×2.5 cm 大に切り取り，ティシュセルにシリコングリースで貼り付ける．これを ESR のキャビティに差し込み，ラジカル測定を行う．X バンド ESR（JES-RE2X, JEOL）での測定条件例を示す．
- (1) マイクロ波周波数　9.40 GHz
- (2) マイクロ波出力　3 mW
- (3) 磁場変調　幅 0.1 mT，周波数 100 kHz
- (4) 応答時間　0.3 s
- (5) 磁場（中央）　337.5 mT
- (6) 磁場掃引速度　1.25 mT/min

3．ポジティブコントロールとして，葉切片に 0.1 mM メチルビオローゲンを減圧吸引によって与え，暗所で 30 分置いた後，ESR キャビティ内で光照射する．Asc˙ ラジカルが超微細結合定数 0.23 mT のダブレットシグナルとして観測できる．

4．一次微分シグナルの一方のピークの山と谷との差をシグナル強度として評価する．これは Asc˙ ラジカルの定常濃度に対応する（絶対値は求められない）．

### 1.d.5.2 プローブ試薬を用いた活性酸素の in situ 検出

生組織に蛍光プローブや発色試薬を与え，活性酸素を検出する方法は，活性酸素生成部位の空間的な分布を知ることができ，シグナル作用研究などに最近よく用いられている[48]．プローブ試薬は活性酸素種と反応して比較的安定な化学形に変化し，この蓄積量を評価する．すなわちこれらの方法では，活性酸素生成量の積算値に相当するパラメータが得られる．細胞内の反応であり，検量線を得ることは困難で，測定試料に対する適切なコントロール試料と比較しシグナル強度の大小を判定する．

in situ 測定では 2 つの注意点がある．(1) プローブ試薬の活性酸素種に対する特異性．ほとんどの場合，活性酸素種の検出はプローブ試薬との酸化還元反応を利用している．例えばニトロブルーテトラゾリウム（NBT）による $O_2^{\cdot-}$ 検出は NBT の還元で生成するホルマザンの発色を $O_2^{\cdot-}$ の指標とするが，この還元反応は AsA によっても進行する．検出されたシグナルが AsA によらないことを確認するコントロール実験が必要である．また，プローブ試薬の細胞内代謝や葉緑体チラコイド電子伝達系での直接酸化還元の可能性を検証する実験が必要である．(2) プローブ試薬の組織内，細胞内分布の均一性．例えば葉の組織にプローブ試薬を与える場合，葉脈から蒸散流によって吸引させると維管束に沿って試薬が分布する．より均一に分布させるには気孔からの減圧吸引や，葉面にピンホールを作り，針のないシリンジで加圧注入するといった方法がある[49]．ただし組織に強制的に溶液を注入した直後は細胞間隙が水で満たされておりガス交換が制限されるため，暗所では酸素不足，光照射下では $CO_2$ 不足となることに留意する必要がある．

なお，動物細胞での活性酸素プローブ使用に関する総説[17,50]も参照されたい．

#### 1.d.5.2.1 ニトロブルーテトラゾリウム（NBT）による $O_2^{\cdot-}$ の in situ 検出[51]

NBT は $O_2^{\cdot-}$ により還元され，青色で不溶性のホルマザンとなり，組織に沈着する．NBT 水溶液 6 mM を減圧吸引によりシロイヌナズナ葉に浸透させ，葉の半分を遮光し，強光（600 $\mu$mol $m^{-2}s^{-1}$）を 60 分間照射する．クロロフィルを脱色するため，乳酸：グリセロール：エタノール（1：1：4 (v/v)）混液中で 5 分間煮沸した後，ホルマザンの青色を観察する．光照射部と遮光部を比較することで，光照射による $O_2^{\cdot-}$ 生成を見積もることができる．上述のように NBT は AsA による非酵素的還元を受ける．また，アルコールデヒドロゲナーゼの存在下で NAD(P)H により還元される．上記の実験で観測した NBT 還元が $O_2^{\cdot-}$ によるという結論は，光照射では AsA や NAD(P)H は増大しないとの仮定に基づいている．

#### 1.d.5.2.2 3,3′-ジアミノベンジディン（DAB）による $H_2O_2$ の in situ 検出

細胞外から与えた DAB は細胞内にも浸透し，ペルオキシダーゼの存在下で $H_2O_2$ により酸化されポリマーを形成し，細胞に沈着する[52]．植物細胞内外の各コンパートメントにはペルオキシダーゼが存在するため，DAB の酸化は $H_2O_2$ の生成に対応する．DAB は酸性条件（pH 3.8）で水溶性となるので，DAB 塩酸塩（たとえば同仁化学，D 006）を用いればよい．5 mM 溶液を調製し，減圧吸引によりシロイヌナズナ葉に浸透させる．あるいは DAB 溶液に 0.1% TritonX-100 を加え，この液に 8 時間浸しておく．この葉を 1 d.5.2.1 と同様に一部遮光し，強光照射後，クロロフィルの脱色を行う．光照射を受けた部位は赤褐色の色素が形成されており，$H_2O_2$ の生成を示す[51]．DAB は直接光を吸収し着色する．生成した $H_2O_2$ が光合成電子伝達反応に由来することを検証するコントロール実験として，30 $\mu$M DCMU など光合成電子伝達阻害剤を与え光照射する．また，カタラーゼを組織に与えて DAB の酸化が抑制されれば，細胞外で $H_2O_2$ が生成したことが確認できる．

#### 1.d.5.2.3 蛍光プローブを用いた $^1O_2$ と $O_2^{\cdot-}$ の in situ 検出

dansyl-2, 2, 5, 5-tetramethyl-2, 5-dehydro-1H-pyrrole（DanePy）は蛍光物質であり $^1O_2$ と反応し酸化されると蛍光を失う．$^1O_2$ に選択性が高いが，$O_2^{\cdot-}$，$H_2O_2$ によっても酸化される[53]．DanePy を葉に与え，強光照射などで $^1O_2$ を生成させたときに消失する蛍光を蛍光顕微鏡や蛍光イメージアナライザーで評価する．励起波長 330–345 nm での発光は溶液中で 550 nm，葉の組織中では 532 nm に極大をもつ．葉には減圧吸引あるいはピンホールからの加圧によって与える．葉に与えた DanePy は代謝され次第に蛍光を失うため，光照射と同じ時間だけ暗所においたときの蛍光低下を測定し，これを差し引くことで光照射による $^1O_2$ を評価する[54]．もう一つの蛍光物質 HO-1889NH（励起 330 nm，発光 540 nm）は $^1O_2$，$O_2^{\cdot-}$ どちらでも酸化され，蛍光を失う[49]．これらのプローブを与えたインゲンマメ葉に UV-B 照射すると，HO-1889NH の蛍光が消光し DanePy の蛍光が消光しなかった．これは UV-B 照射によって葉で $O_2^{\cdot-}$ が生成することを示す[49]．

Singlet Oxygen Sensor Green（SOSG；モレキュラープローブ社）は非蛍光性であり，$^1O_2$ と反応して蛍光性（励起 480 nm，発光 532 nm）となる[54a]．使用に際しては光化学系 II 活性を 10%程度阻害することを考慮する必要がある[54b]．

## 1.d.6 おわりに

冒頭で述べたように細胞内での活性酸素種の生成フラックスはかなり大きい．しかし，細胞には大量の抗酸化物・抗酸化酵素が存在するため，活性酸素種の定常濃度はきわめて低いレベルに保たれている．おおまかに言って，活性酸素消去能が一定であれば，活性酸素定常濃度は生成フラックスに比例して増大する．一方，生成フラックスが一定でも消去能が低下すれば定常濃度は容易に一桁以上上昇する．生体内の活性酸素の動態をできるだけ正確に把握するには，生成速度の変動だけでなく消去活性の変化も常に意識しなければならない．実際，活性酸素消去酵素の中には活性酸素によって失活しやすいものがあり，また環境ストレス条件下で特定の酵素だけが失活する例もある[55,56]．本節では述べなかったが，活性酸素消去酵素の活性評価も細胞の酸化的ストレス状態を知る上で重要であることを指摘しておきたい．

活性酸素種の「分かりにくさ」は，その寿命の短さに負うところが大きいが，時間と空間のスケールを日常感覚の 1000〜100 万倍ほど拡大して考えてみれば，これらの分子がそれほど特別な性質をもつわけではないことが理解できるとおもう．化学，とくに反応速度論的理解に基づき，活性酸素と抗酸化物質，標的分子の細胞内でのふるまいを正しくイメージできるようになれば，実験結果の解釈において大きな間違いは防げるはずである．

## 参考文献


1）C. H. Foyer and G. Noctor, *Physiol. Plant*. **119** (2003) p. 355
2）K. Asada, *Plant Physiol*. **141** (2006) p.391
3）真野純一，浅田浩二，蛋白質核酸酵素 **44**（1999）p.2239
4）浅田浩二，「植物の環境応答」（1999）秀潤社，p.107
5）K. Asada, K. Kiso and K. Yoshikawa, *J. Biol. Chem*. **249** (1974) p.2175
6）C. Miyake, U. Schreiber, H. Hormann, S. Sano and K. Asada, *Plant Cell Physiol*. **39** (1998) p.821
7）A. Telfer, S. M. Bishop, D. Philips and J. Barber, *J. Biol. Chem*. **269** (1994) p.13244
8）G. Ananyev, G. Renger, U. Wacker and V. Klimov, *Photosynth. Res*. **41** (1994) p.327
9）P. Propíšil, A. Arató, A. Krieger-Litzkay and A. W. Rutherford, *Biochemistry* **43** (2004), p.6783
10）É. Hideg, C. Spetea and I. Vass, *Biochim. Biophys. Acta* **1186** (1994) p.143
11）S. Khorobrykh, M. Mubarakshina and B. Ivanov, *Biochim. Biophys. Acta* **1657** (2004) p.164
12）S. Jasid, M. Simontacchi, C. G. Bartoli and S. Puntarulo, *Plant Physiol*. **142** (2006) p.1246
13）Y. Sakihama, S. Nakamura and H. Yamasaki, *Plant Cell Physiol*. **43** (2002) p.290
14）M. Romero-Puertas, M. Laxa, A. Mattè, F. Zaninotto, I. Finkemeier, A. M. E. Jones, M. Perazzolli, E. Vandelle, K.-J. Dietz and M. Delledonne, *Plant Cell* **19** (2007) p. 4120
15）J. N. Bouchard and H. Yamasaki, *Plant Cell Physiol*. **49** (2008) p.641
16）谷口直之（編著），「活性酸素実験プロトコール」秀潤社，1994
17）二木鋭雄，野口範子，内田浩二(編)，「酸化ストレスマーカー」学会出版センター，2005
18）「活性酸素」蛋白質核酸酵素臨時増刊 33，No.6（1988）共立出版
19）斉藤烈，松浦輝男，化学総説，No.7（1990）p.3
20）B. Halliwell and J. M. C. Gutteridge, Free Radicals in Biology and Medicine, Fourth edition, Oxford, Oxford Univ. Press, 2007
21）W. H. Koppenol, *Pure Appl. Chem*. **72** (2000) p.437
22）http://www.healthcare.uiowa.edu/CoreFacilities/esr/education/FRRB-FreeRad-names.pdf
23）大矢博昭，山内淳，「電子スピン共鳴」講談社サイエンティフィク，1989
24）G. M. Rosen, B. E. Britigan, H. J. Halpern and S. Pou, *Free Radicals* (1999) Oxford Univ. Press
25）K. Stolze, N. Udilova and H. Nohl, *Free Radic. Biol. Med*. **29** (2000) p.1005
26）R. C. Ford and M. C. W. Evans, *FEBS Lett*. **160** (1983) p.159
27）C. Miyake and K. Asada, *Plant Cell Physiol*. **35** (1994) p.539
28）J. Mano, T. Ushimaru and K. Asada, *Photosynth. Res*. **53** (1997) p.197
29）J. Mano, É. Hideg and K. Asada, *Arch. Biochem. Biophys*. **429** (2004) p.71
30）J. Mano, C. Ohno, Y. Domae and K. Asada, *Biochim. Biophys. Acta* **1504** (2001) p.275
31）N. Soh, T. Ariyoshi, T. Fukaminato, K. Nakano, M. Irie and T. Imato, *Bioorg. Med. Chem. Lett*. **16** (2006) p. 2943
32）K. Khorobrykh, A. Khorobrykh, J. Mano, 投稿中.
33）G. Queval, J. Hager, B. Gakière and G. Noctor, *J. Exp. Bot*. **59** (2008) p.135
34）J. M. Cheeseman, *J. Exp. Bot*. **57** (2006) p.2435
35）D. M. Hodges, J. M. DeLong, C. F. Forney and R. K. Prange, *Planta* **207** (1999) p.604
36）M. C. Romero-Puertas, J. M. Palma, M. Gómez, L. A. del Río and L. M. Sandalio, *Plant Cell Environ*. **25** (2002) p.677
37）I. M. Møller, P. E. Jensen and A. Hansson, *Annu. Rev. Plant Biol*. **58** (2007), p.459
38）内田浩二，「酸化ストレスマーカー」学会出版センター，2005，p.80
39）Y. Yamauchi, A. Furutera, K. Seki, Y. Toyoda, K. Tanaka and Y. Sugimoto, *Plant Physiol. Biochem*. **46** (2008) p.786
40）C. Triantaphilidès, M. Krischke, F. A. Hoeberichts, B. Ksas, G. Gresser, M. Havaux, F. Van Breusegem, M. J. Mueller, *Plant Physiol*. **148** (2008) p.960
41）N. A. Porter, *Methods Enzymol*. **105** (1984) p.273
42）J. Lykkesfeldt. *Anal. Biochem*. **282** (2000) p.89
43）K. Kampfenkel, M. V. Mongatu, and D. Inzé. *Anal. Biochem*. **225** (1995) p.165
44）K. Amako, T. Ushimaru, A. Ishikawa, Y. Ogishi, R. Kishimoto and K. Goda. *J. Nutr. Sci. Vitaminol*. **92** (2006) p.89
45）M. A. Baker, G. J. Cerniglia, and A. Zaman. *Anal. Biochem*. **190** (1990) p.360
46）R. A. Winters, J. Zukowski, N. Ercal, R. H. Matthews and D. R. Spitz, *Anal. Biochem*. **227** (1995) p.14
47）U. Heber, C. Miyake, J. Mano, C. Ohno and K. Asada, *Plant Cell Physiol*. **37** (1995) p.1066
48）F. van Breusegem, J. Bailey-Serres and R. Mittler, *Plant Physiol*. **147** (2008) p.978
49）É. Hideg, C. Barta, T. Kálai, I. Vass, K. Hideg and K. Asada, *Plant Cell Physiol*. **43** (2002) p.1154
50）B. Halliwell and M. Whiteman, *Br. J. Pharmacol*. **142** (2004) p.231
51）M. Fryer, K. Oxborough, P. M. Mullineaux and N. R. Baker, *J. Exp. Bot*. **53** (2002) p.1249
52）H. Thordal-Christensen, Z. Zhang, Y. Wei and D. B.

Collinge, *Plant J*. **11** (1997) p.1187
53) T. Kálai, É. Hideg, I. Vass and K. Hideg, *Free Radic. Biol. Med*. **24** (1998) p.649
54) É. Hideg, T. Kálai, K. Hideg and I. Vass, *Biochemistry* **37** (1998) p.11405
54a) C. Flors, M. J. Fryer, J. Waring, B. Reeder, U. Bechtold, P. M. Mullineaux, S. Nonell, M. T. Wilson, N. R. Baker, *J. Exp. Bot.* **57** (2006) p.1725
54b) É. Hideg, *Cent. Eur. J. Biol.* **3** (2008) p.273
55) J. Mano, Oxidative Stress in Plants, ed. D. Inzé and M. von Montagu, London, Francis & Taylor, 2002, p.217
56) S. M. Choi, S. W. Jeong, W. J. Jeong, S. Y. Kwon, W. S. Chow and Y.-I. Park, *Planta* **216** (2002) p.315

# 2．光合成膜などの単離
## a．高等植物の葉緑体と葉緑体膜の単離

宮尾　光恵[1)]

高等植物の緑葉から無傷葉緑体を単離する方法，葉緑体膜（包膜とチラコイド膜）の単離法，および，チラコイド膜から光化学系II膜を調製する方法を紹介する．

## Isolation of intact chloroplasts, thylakoids and photosystem II membranes from higher plants

Mitsue Miyao

Intact chloroplasts and subchloroplast membranes can be purified from a variety of plant species by applying standard procedures with slight modification. This article summarizes procedures for isolation of intact chloroplast and subchloroplast membranes including envelope, thylakoid and photosystem II membranes.

### 2.a.1　概論

高等植物の緑葉から無傷葉緑体，包膜，チラコイド膜を単離・精製する方法は，1980年代にはほぼ確立された．その多くは，ホウレンソウ，コムギ，エンドウ，レタス等，光合成研究材料として「使いやすい」植物，すなわち，材料が大量にかつ容易に入手でき，葉が柔らかく，ポリフェノール，粘稠な貯蔵物質（例えば，フラクタン）等，精製を妨害する物質が少ない植物を対象としたものがほとんどであった．一方，近年の植物科学の進展にともない，アラビドプシスやイネ等のモデル植物，野生植物等，広汎な植物種が研究材料として用いられるようになってきている．材料が異なっても，先人の確立した「古典的な」単離精製法は適用可能であり，多くの場合破砕方法と破砕液の組成を若干改変するだけで純度の高い標品を得ることができる．本章では，ホウレンソウまたはエンドウを材料とした古典的な方法を紹介するとともに，他の植物種への適用法を概説する．なお本章では，葉肉細胞から葉緑体と葉緑体膜（チラコイド膜，包膜，光化学系II膜）を単離する方法を扱う．$C_4$植物維管束鞘細胞および藻類の葉緑体単離法は文献1）を，クラミドモナスからの葉緑体，チラコイド膜単離法，シアノバクテリアのチラコイド膜単離法は第3章を参照されたい．

葉緑体および葉緑体膜の単離は，組織の破砕，遠心分離法による分画，密度勾配遠心分離法による精製の3段階に大別できる．全般的な注意事項は以下の通りである．

① すべての操作を0-4℃で行う．また，すばやく作業する．使用する溶液，器具類を予冷し，氷中あるいは氷上で作業を行う．遠心分離機の側で作業するのが望ましい．

② 弱光下で作業する．作業場所は暗い方が望ましいが，日光が差し込まない部屋（光強度5 $\mu$mol $m^{-2}s^{-1}$程度）であれば，作業場所の天井照明を消す程度（光強度1 $\mu$mol $m^{-2}s^{-1}$以下）で充分である．試料を氷中で保存するときは，必ず遮光する（光を通さないアイスバケットに入れるかアルミホイルで覆う）．

③ 懸濁液が薄い（葉緑体や葉緑体膜の濃度が低い）と，光傷害や物理的損傷を受けやすくなる．組織破砕液，試料懸濁液ともに，不透明の濃い緑色になるようにする．最終的な精製標品は，できるだけ濃く懸濁する．

④ 試料の遠心沈殿は，水彩絵筆を使って穏やかに懸濁する．この時，沈殿に直接かからないように懸濁溶液を添加する（溶液がかかると沈殿がダマになって遠心管壁からはがれ，均一に懸濁できない）．溶液で濡らした絵筆で沈殿の表面をなでるようにして，少しずつ沈殿を懸濁する．

⑤ 無傷葉緑体は0-4℃で保存しても徐々に包膜が破壊される．また，凍結融解で包膜が破壊される．他の葉緑体膜標品は，0.4-0.8 Mショ糖（高濃度の方が望ましい）を含む溶液に濃く懸濁すれば活性を保持したまま凍結保存できる．液体窒素中で保存するか，液体窒素で急速凍結したのち－80℃で保存する．使用時は水浴で速やかに融解し，融解したら氷中に移す．ショ糖は生体膜とタンパク質の安定作用をもつが，融解に要する時間を短くする効果もある．無傷葉緑体の凍結保

1）独立行政法人農業生物資源研究所　光環境応答研究ユニット

存にも高濃度のショ糖を加える．

## 2.a.2　材料の前処理と葉の破砕

### 2.a.2.1　材料の前処理

葉のデンプン含量が高いと，分画遠心法で単離した葉緑体や葉緑体膜にデンプンが混入し完全には除去できない．またデンプン粒は葉緑体より密度が高いため，無傷葉緑体を遠心分離する際，葉緑体内のデンプンが包膜を突き破ってしまう．ホウレンソウ，タバコ，ジャガイモ，アラビドプシス等，デンプンを葉内に蓄積する植物では，破砕に先立ってデンプン含量を低下させる処理を行う．市販のホウレンソウは，植物体を水道水で充分に洗ったのち，3-4 cm の深さに水を張ったバケツに入れサランラップをかけて低温室に一晩置くか，湿らせた新聞紙に包んでビニール袋に入れて冷蔵庫で保存する．どちらの場合も 2-3 日は保存できる．タバコ，ジャガイモ，アラビドプシスはいわゆる「デンプン葉」で，葉のデンプン含量が高い．タバコ成熟葉の場合，植物体を 2-3 日弱光下（実験室内；光強度 5 $\mu$mol $m^{-2}s^{-1}$ 程度）に置くとデンプンをかなり減らすことができる．イネ，コムギ等，単子葉植物の多くは「糖葉」で，デンプンは葉身ではなく葉鞘に蓄積される．葉身のみを使用すればデンプンの混入は比較的少ない．また，破砕前日に植物体を暗所に移動すればデンプンをかなり減らすことができる．

### 2.a.2.2　破砕溶液の組成

基本的組成は，浸透圧調節剤，pH 緩衝剤，塩類である．浸透圧調節には，無傷葉緑体の場合 0.33 M ソルビトール，チラコイド膜の場合 0.3-0.4 M ショ糖を用いる．植物材料の性質，単離標品の使用目的に応じて保護物質を添加する．例えば，EDTA は重金属の除去，牛血清アルブミン（BSA）は膜の安定化と遊離脂肪酸の除去，フィコール（Ficoll），ポリエチレングリコール（PEG），デキストランは膜の安定化と粘度の調節のために用いられる．酸化防止剤としてジチオスレイトール（dithiothreitol, DTT），2-メルカプトエタノール，アスコルビン酸，イソアスコルビン酸等の還元剤が用いられる．ホウレンソウ等の一般的な光合成研究材料であれば，特別な保護物質は必要ない．

留意が必要なのは植物組織のポリフェノール含量で，ポリフェノールが酸化されると試料が褐変し，葉緑体や葉緑体膜の凝集（アグリゲート）を引き起こす（水溶性タンパク質もアグリゲートを形成し，SDS で可溶化できなくなる）．タバコはポリフェノール含量が高いが，葉の破砕から遠心分離による葉緑体の沈殿までの操作をすばやく行えば，ホウレンソウと同じように取り扱うことができる（組織破砕液の遠心上清は褐変するが，葉緑体は褐変しない）．それでも試料が褐変する場合は，破砕液に 5-20 mM の還元剤（DTT，アスコルビン酸）を添加する．ポリフェノールとアルカロイドの吸着剤である水溶性ポリビニルピロリドン（polyvinylpyrrolidone, PVP；例えば，PVP-400, Sigma）を 1-2 %（w/v）添加してもよい．多くの場合還元剤だけで褐変は抑えられる．

### 2.a.2.3　葉の破砕と濾過

大概の葉は市販の家庭用ミキサー（容量 0.5-1.5 リットル）で破砕できる．材料が少ないときは，ワーリングブレンダー（Waring 社；ステンレス製カップに上から刃を入れて破砕するタイプ）で小さいカップに入れて破砕する．材料が極少量のときはガラスホモジナイザーを使う．硬い葉や茎の破砕にはワーリングブレンダーあるいはポリトロン（Kinematica 社）を使用する．

破砕液をまず 2 層のガーゼ，引き続き 16 層のガーゼで濾過し，葉の破砕断片を除く．濾過が遅くなったらガーゼを交換する．特に最初のガーゼ 2 層は詰まりやすいので，複数セット用意して頻繁に交換する．組織破砕液には液胞由来のプロテアーゼが含まれるため，組織の破砕から破砕液の遠心分離作業は特にすばやく行う．

**[実験方法：家庭用ミキサー（容量 1 リットル）による葉の破砕]**

1．使用する溶液類と器具類は予め氷中で冷やしておく．ミキサーは氷を入れて予冷する．
2．双子葉植物の葉は 5 cm 程度の大きさにちぎり，氷に入れたビーカーに入れて冷やす．単子葉植物の葉はハサミで長さ 3-5 mm 程度に裁断する．
3．ミキサーの氷を捨て予冷した破砕液ですすぐ（水が混じって浸透圧が低下するのを避けるため）．
4．ミキサーの刃の 3-4 倍の高さまで葉片を軽く入れ，そこに刃の高さ程度の破砕液（30-40 mL）を注ぎ，フラッシュ（一瞬破砕してすぐに停止する操作）を 3-4 回繰り返す．双子葉植物の葉であればこの操作で葉片は 1-3 cm 程度に破砕される．単子葉植物の場合は，葉片が破砕液になじんでかさばらなくなる．さらに葉片を加えて 2-3 回フラッシュする．これを 3-4 回繰り返す．フラッシュしても破砕液がかき混ぜられなくなったら，破砕溶液を少しずつ追加する．カップに入れた葉片がほぼ均一になったら，2 秒から数秒間破砕する．無傷葉緑体を単離する場合は 3 秒程度，チラコイド膜を単離する場合は 3 秒の破砕を 2-3 回繰り返す．

5．破砕液を速やかに濾過し，遠心分離する．三角フラスコにガーゼをセットした漏斗を立てておくと，すばやく濾過できる．

この方法で単子葉植物（イネ，コムギ）の葉も完全に破砕できる．用いる破砕溶液の量は，葉片 20–30 g に対して双子葉植物（ホウレンソウ，タバコ）で約 100 mL，単子葉植物（イネ，コムギ）で約 200 mL である．

## 2.a.3　無傷葉緑体の単離と精製

緑葉破砕液からまず分画遠心法で葉緑体を粗精製し，引き続き Percoll（GE Healthcare）密度勾配遠心分離法で精製する．かつてはショ糖密度勾配遠心法が精製に使用されていたが，ショ糖は包膜を透過し葉緑体の浸透圧が高くなるため，浸透圧を変えずに密度勾配を形成できる Percoll が用いられている．また，Percoll 密度勾配法では密度以外に試料表面の電荷も分離に影響する．この効果により，壊れた葉緑体と無傷葉緑体とを効率よく分離することができる[注1]．

得られた葉緑体標品の無傷度（intactness）は光学顕微鏡で簡単に観察できる．無傷葉緑体はきらきら光る緑の顆粒のように見える．脱イオン水で低張にして包膜を破壊すると，光らない暗緑色の粒になる．

無傷葉緑体は不安定で，氷中暗所で保存しても徐々に包膜が破壊される．包膜が壊れると小さなダマ状のアグリゲートができる．葉緑体懸濁液にダマができたら葉緑体の一部が壊れたと考えられる．

### 2.a.3.1　分画遠心による無傷葉緑体の粗精製

定法とされている無傷葉緑体単離法のほとんどは，収率は低くとも大量の出発材料から純度の高い標品を得ることを目的に開発された．ホウレンソウでは 2,000–2,500× $g$ で 30–60 秒間遠心し，葉緑体を沈殿させる．この遠心をもう一度繰り返したのち，500–600× $g$ で 10 秒程度遠心し夾雑物（未破壊の細胞，デンプン等）を沈殿させて除く「下切り」を行う．葉緑体を沈殿させる遠心条件をきつくする，あるいは，下切り条件を緩くすれば，純度は低下するが収率を上げることができる．ただし，葉緑体の沈殿条件をきつくしすぎると壊れた葉緑体も沈殿するため，無傷葉緑体がアグリゲートを形成しやすくなる．

破砕溶液，葉緑体懸濁溶液の一般的な組成は，0.33 M ソルビトール，1–5 mM $MgCl_2$，10–20 mM NaCl，pH 緩衝剤（MES, HEPES, Tricine；pH 6–8）である．炭酸固定活性を保持した無傷葉緑体の単離には 1 mM $MnCl_2$, 1 mM EDTA, 2 mM イソアスコルビン酸が必要とされている[1–3]．

#### [実験方法：Nakatani & Barber の方法[4]]

$Mg^{2+}$ は生体膜の安定化（チラコイド膜ではグラナ構造の維持）に必要であるが，$Mg^{2+}$ があると壊れた葉緑体やチラコイド膜がアグリゲートしやすくなる（おそらく DNA もアグリゲート形成に関与）．本法では，アグリゲート形成を抑えるため定法よりかなり低いイオン強度と $Mg^{2+}$ 濃度で葉緑体を単離する．

1．葉片 30–40 g を 100 mL の A 液（0.33 M ソルビトール，0.2 mM $MgCl_2$，20 mM MES，Tris 溶液で pH を 6.5 に調整；最終 Tris 濃度は約 0.5 mM）で破砕し，破砕液を濾過したのち，2,200× $g$ で 30 秒間遠心する．ハンドブレーキ[注2] でロータを減速させ遠心に要する時間を 90 秒以内とする．
2．アスピレーターにつないだパスツールピペットで上清を速やかに取り除く．沈殿表面のどろどろした緑色のスラリーと緩い沈殿（破壊された葉緑体やチラコイド膜を含む）も除く．遠心管をキムタオルの上に数秒倒立させて，残った上清とスラリーを切る．
3．筆で沈殿を B 液（0.33 M ソルビトール，Tris 溶液で pH を 7.5 に調整；最終 Tris 濃度は約 0.5 mM）約 40 mL に懸濁する．激しく懸濁すると包膜が破壊されるので，筆で沈殿の表面を軽くなでるように丁寧に少しづつ懸濁する．
4．懸濁液を 2,200× $g$ で 20 秒間遠心する．ハンドブレーキでロータを減速させ遠心に要する時間を 60 秒以内とする．
5．沈殿を B 液 1–2 mL に懸濁する．

ホウレンソウの場合，無傷葉緑体の割合（intactness）は最初の沈殿が 75%以上，2 回目の沈殿がほぼ 100%で，Percoll 密度勾配法で精製した標品とほぼ同等のポリペプチド組成の標品が得られる．この無傷葉緑体標品にはデンプンが混入するが，短時間の下切り遠心（500–600× $g$ に達したらハンドブレーキで減速）で除くことができ

[注1] 緑葉を破砕すると，無傷葉緑体や壊れた葉緑体が DNA にからまるように吸着してアグリゲートを形成する．このアグリゲートの密度は無傷葉緑体とほぼ同じなため，ショ糖密度勾配遠心法では分離できない．Percoll 密度勾配遠心法の場合アグリゲートは無傷葉緑体より低密度の位置にバンドを形成する．

[注2] 遠心停止ボタンを押し，遠心機の蓋を開けて手でロータを減速させる．この時，雑巾あるいは小さいタオルを両手に持ち，左右対称になるように両手でロータを軽く押さえる．最初は軽く振れ，アンバランスが無ければ徐々に強く押さえる．ロータが止まる直前には手を離す．

る．Percoll 密度勾配遠心法で葉緑体を精製するときは2回目の遠心を省略できる．

本法はほとんどの双子葉植物と単子葉植物に適用可能であるが，ケイ酸含量の高いイネでは無傷葉緑体の収率は必ずしも高くない．これは，葉の破砕液中のケイ酸の結晶が包膜を物理的に破壊するためで，葉の柔らかい幼苗を用いた場合でも操作ステップ数を増やすと収量が激減するので注意が必要である．

### 2.a.3.2 Percoll 密度勾配遠心分離法による無傷葉緑体の精製

1979 年に報告された高倍らの方法[5] が，高純度で生理活性（炭酸固定活性）の高い葉緑体を精製するもっとも優れた方法である．100 mL の Percoll に PEG 6000（Sigma）を 5 g，BSA を 1 g，Ficoll 400 を 1 g 添加した溶液（PPBF）で密度勾配をつくる．炭酸固定活性を問題にしないのであれば，Percoll のみ（ソルビトールと pH 緩衝剤のみ，あるいは保護物質として 0.1%程度の BSA を含む）の密度勾配で充分である．無傷葉緑体の密度と大きさは均一でないため，連続密度勾配を使うと無傷葉緑体は幅の広いバンドを形成する．葉緑体がバンドを形成する Percoll 濃度を予め決めておけば，不連続（段階的）密度勾配で精製できる．

**[実験方法 1 ：高倍らの方法[5]]**

- 破砕溶液：0.33 M sorbitol, 2 mM $Na_2$-EDTA, 1 mM $MnCl_2$, 1 mM $MgCl_2$, 20 mM NaCl, 2 mM isoascorbic acid, 50 mM MES-NaOH, pH 6.1.
- グラジエント・再懸濁（G-R）溶液：0.33 M sorbitol, 2 mM $Na_2$-EDTA, 1 mM $MnCl_2$, 1 mM $MgCl_2$, 1 mM pyrophosphate, 5 mM isoascorbic acid, 5 mM gluthathione, 50 mM HEPES-NaOH, pH 6.8.
- Percoll 密度交配：11－90%（v/v）PPBF．他の組成は G-R 溶液と同じ．40 mL 遠心管（日立スイングロータ SW-27 用）に 35 mL の連続密度勾配を作製．

炭酸固定活性の保持を目的としないのであれば，破砕溶液と G-R 溶液の $MnCl_2$, EDTA, ピロリン酸，イソアスコルビン酸，グルタチオンは除いても構わない．

1．連結管を用いて Percoll 連続密度勾配を作製し，氷中あるいは冷蔵庫で 0－4 ℃に冷却する．
2．ホウレンソウ葉片 35 g を 120 mL の破砕溶液で破砕，濾過し，2,500× $g$ で 70 秒間遠心する．
3．沈殿を破砕溶液 5 mL に懸濁し，Percoll 密度勾配に 2 mL ずつ重層する．
4．スイングロータを用い，7,000 rpm（8,820× $g$）で 15 分間遠心する．
5．形成される 2 本の緑色バンドのうち，上（低密度側）がチラコイド膜と壊れた葉緑体を含むバンド，下（高密度側）が無傷葉緑体のバンドである．注射器で無傷葉緑体のバンドを吸い取り 3 倍容の G-R 溶液で希釈する．
6．2,500× $g$, 70 秒の遠心で無傷葉緑体を沈殿させる．Percoll が残っているため，沈殿はゆるく，また遠心管の底を滑りやすい．駒込ピペットかアスピレーターで沈殿を吸い込まないように注意しながら上清を除く．
7．Percoll 密度勾配中の BSA 濃度が高いため，無傷葉緑体に大量の BSA が付着している．BSA を除くには，沈殿の再懸濁と遠心操作を 2-3 回繰り返す．

**[実験方法 2 ：不連続（段階的）密度勾配を用いる方法[6]]**

密度勾配の作製が容易な簡便法である．2 種類の Percoll 層の界面に無傷葉緑体が集積するため高濃度の葉緑体を回収できる．

- 葉緑体懸濁溶液（A 液）：0.33 M sorbitol, 30 mM HEPES-NaOH（pH 7.8）
- Percoll 密度勾配：50%および 80% Percoll, 0.1% BSA, 0.33 M sorbitol, 30 mM HEPES-NaOH（pH 7.8）．50 mL 遠心管に 80% Percoll を 10 mL 入れ，その上に 50% Percoll を 20 mL 重層する．

1．Nakatani & Barber の方法[4] で調製したホウレンソウ無傷葉緑体粗画分（2 回目の遠心沈殿）を 0.1% BSA を含む A 液に懸濁し，Percoll 密度勾配に重層する．
2．スイングロータを用い，8,500× $g$ で 15 分間遠心する．ロータをゆっくり加速・減速させれば，アングルロータも使用できる．
3．チラコイド膜と壊れた葉緑体は Percoll 層上部にとどまり，無傷葉緑体は 50%と 80% Percoll の界面にシャープなバンドを形成する．パスツールピペットで無傷葉緑体バンドを回収し，A 液で 3-5 倍に希釈する．
4．2,500× $g$ で 60 秒間遠心し，沈殿を A 液に懸濁する．
5．再遠心し，沈殿を A 液に再懸濁する．

**[実験方法 3 ：一段階簡易精製法[6]]**

粗葉緑体標品を Percoll 液に重層し，遠心により無傷葉緑体のみ Percoll 層を通過させ沈殿させる方法である．壊れた葉緑体は Percoll 層上部にとどまる．Nakatani & Barber の方法[4] で粗精製した無傷葉緑体を用

いれば，充分に純度の高い葉緑体が得られる．収率が高いので，少量の材料からの無傷葉緑体の精製に適用できる．また，様々な処理を施した葉緑体標品から無傷葉緑体のみを回収する際に用いられる（例えば，プロテアーゼであるサーモリシン（thermolysin）処理[7]；包膜表面に露出したタンパク質の同定や包膜表面に付着したタンパク質の除去に用いられる）．

・葉緑体懸濁溶液（A液）：0.33 M　sorbitol，30 mM HEPES-NaOH（pH 7.8）
・Percoll 密度勾配：40% Percoll, 0.1% BSA, 0.33 M sorbitol，30 mM HEPES-NaOH（pH 7.8）．

1．遠心管に 40% Percoll を入れ，その上に粗精製した無傷葉緑体画分（クロロフィル濃度 1-2 mg/mL）を重層する．
2．スイングロータで 3,000× $g$，5 分間遠心する．ロータをゆっくり加速・減速させればアングルロータも使用できる．
3．得られた無傷葉緑体の沈殿をA液に懸濁する．
4．2,500× $g$ で 60 秒間遠心し，沈殿をA液に懸濁する．
5．再遠心し，沈殿をA液に懸濁する．

Percoll 層の厚さと遠心条件は，使用するロータ，出発材料の量と精製度に応じて適宜調節する．スケールダウンも可能で，1.5 mL のディスポーザブルチューブの場合，40% Percoll 1 mL に粗精製葉緑体 0.4 mL を重層し，5,000× $g$ で 2 分間遠心する（ホウレンソウ，タバコ）．無傷葉緑体の沈殿の量，無傷葉緑体と Percoll 層上部の壊れた葉緑体との分離を目で確認しながら，最適条件を決める．

## 2.a.4　葉緑体包膜の単離

葉緑体包膜の密度はミクロゾームやミトコンドリア外膜の密度とほぼ同じなので，精製した無傷葉緑体を出発材料として用いる．まず葉緑体を高張処理し包膜を剝離させる．葉緑体を 0.6 M ショ糖あるいは 0.8 M マンニトールを含む溶液に懸濁すると，透過性の差から内包膜のみが収縮して内包膜と外包膜の間隔が広がる．この状態で機械的な力を加えたり凍結融解を繰り返すと内包膜と外包膜は別々の小胞となる．剝離した包膜をショ糖密度勾配遠心分離法でチラコイド膜とストロマから分離する．引き続きをショ糖密度勾配遠心分離法で内包膜と外包膜に分離する．

[実験方法：包膜の単離法[8,9]]

チラコイド膜に比べて包膜は非常に少ない．ショ糖密度勾配上に試料を重層し遠心する沈降法（沈降速度法，沈降平衡法）では，包膜より重くかつ大量に存在するチラコイド膜が包膜を「追い越して」沈降する．このため，包膜バンドへのチラコイド膜の混入は避けられない．一方，高濃度のショ糖を加えた試料の上に密度勾配を重層し遠心すると（浮遊遠心法），密度勾配中を包膜が先行して浮上するため，チラコイド膜の混入の少ない包膜を得ることができる．

1．エンドウの無傷葉緑体を 0.6 M ショ糖を含む緩衝液 TE（10 mM Tricine，pH 7.5，2 mM EDTA）にクロロフィル濃度が 1-3 mg/mL になるように懸濁する．
2．懸濁液を 0 ℃で 10 分間静置したのち－20℃で凍結させる．
3．1.5 時間後室温に移し融解させる．エンドウではこの操作で約 70%の葉緑体が破壊される．ホウレンソウでは凍結融解を 2 回繰り返す．顕微鏡で葉緑体の破壊率を調べ，50-75%が破壊されるまで凍結融解を繰り返す．
4．破壊された葉緑体懸濁液にショ糖を加え最終的に 1.3 M とし，15 mL ずつ遠心管に分注する．これに 1.2 M ショ糖を含む TE を 9 mL，さらに 0.3 M ショ糖を含む TE を 6 mL 重層する．
5．スイングロータで 113,000× $g$，14 時間遠心する．包膜は密度勾配中を浮上し，0.3 M と 1.2 M ショ糖の界面に黄色の層を形成する．破壊されなかった葉緑体，チラコイド膜，ストロマ成分は 1.3 M ショ糖中にとどまる．無傷葉緑体 1 mg クロロフィルあたりタンパク質量で 40-70 $\mu$g の包膜が得られる．

[実験方法：内包膜と外包膜の分離精製法[8,9]]

上記の方法で調製した包膜標品を，ショ糖密度勾配中の沈降平衡遠心法で内包膜と外包膜に分離する．また以下に示すように，高張液中で破壊した葉緑体から分画遠心法で包膜を粗精製し，これから内包膜と外包膜を分離すると精製時間を短縮できる．

1．凍結融解法で破壊した葉緑体の懸濁液に 2 倍容の TE を加えショ糖密度を 0.2 M に下げ，これを 4,500× $g$ で 15 分間遠心しチラコイド膜を沈殿させる．
2．上清を 40,000× $g$ で 30 分間遠心し，得られた沈殿（粗包膜画分）を 0.2 M ショ糖を含む TE に懸濁する．

3．懸濁液を 0.6–1.2 M ショ糖連続密度勾配に重層し，スイングロータで 113,000× *g*，14 時間遠心する．密度勾配中にできる 2 本の黄色のバンドのうち，上が外包膜のバンド，下が内包膜のバンドである．

## 2.a.5　チラコイド膜の単離

チラコイド膜は組織破砕液から分画遠心法で単離する．純度の高いチラコイド膜が必要であれば，精製した無傷葉緑体標品から分画遠心法あるいはショ糖密度勾配遠心法でチラコイド膜を精製する．破砕溶液とチラコイド膜懸濁溶液の基本組成は，0.3–0.4 M ショ糖，50 mM pH 緩衝剤（HEPES または Tricine；pH 7.5–7.8），5 mM $MgCl_2$，10 mM NaCl である．5 mM $Mg^{2+}$ はグラナの積み重なり構造の維持に，10 mM $Cl^-$ は酸素発生活性の維持に必要である．

**[実験方法：チラコイド膜の単離]**

1．濾過した組織破砕液を 3,000× *g* で 8–10 分間遠心し，チラコイド膜を沈殿させる．
2．沈殿を懸濁溶液に懸濁し，300× *g* で 30–60 秒間遠心する．
3．遠心上清を 3,000× *g* で 8–10 分間遠心し，チラコイド膜を沈殿させる．
4．沈殿を懸濁溶液に懸濁し，300× *g* で 30–60 秒間遠心する．

遠心条件は，使用するロータ，出発材料の量，必要とするチラコイド膜の純度に応じて適宜調節する．大きいロータを使ってチラコイド膜を大量に調製するときは，ロータの減速が遅いため，ステップ 2 と 4 の「下切り」遠心条件を緩くする（設定回転数に達したら遠心停止スイッチを押す）．なお，チラコイド膜の沈殿の上に形成される濃緑色のスラリーと「下切り」遠心のどろっとした濃緑色の沈殿は，核 DNA によって形成される様々な膜を含むアグリゲートである．

**[実験方法：無傷葉緑体からのチラコイド膜の単離]**

低張処理あるいは凍結融解処理で葉緑体を破壊する．破壊した葉緑体懸濁液を 3,000–10,000× *g* で 10 分間遠心し，チラコイド膜を沈殿させる．遠心上清はストロマ画分として回収する．ストロマ画分を 10,000× *g* で 10 分間遠心すればチラコイド膜の破片を，100,000× *g* で 1 時間遠心すれば包膜を沈殿として除去できる．

1．無傷葉緑体の沈殿を 5 mM $MgCl_2$，50 mM HEPES-NaOH（pH 7.8）に懸濁し，氷上で 10 分間静置する．
2．10,000× *g* で 10 分間遠心し，チラコイド膜を沈殿させる．
3．沈殿を 0.4 M ショ糖，5 mM $MgCl_2$，10 mM NaCl，50 mM HEPES-NaOH（pH 7.8）に懸濁し，再遠心する．
4．懸濁，遠心を 1–2 回繰り返しチラコイド膜を洗浄する．

## 2.a.6　チラコイド膜の分画：光化学系 II 膜の単離

様々な方法でチラコイド膜からグラナチラコイドとストロマチラコイドを単離するすることができる[10]．ストロマチラコイドは Yeda プレス処理，超音波処理でグラナから切り離され小胞となる．また低濃度の界面活性剤処理で小胞または膜断片となる．チラコイド膜にこれらの処理を施し遠心分離すれば，純度の高いストロマチラコイドが単離できる．一方グラナは機械的処理に強く，プレス処理を施すとグラナのマージン（margin；膜の接着部分の周縁）で膜が分断されるが，グラナの積み重なり構造はほとんど破壊されない．このグラナの膜の接着を剝がすと margin の切断部位で膜が閉じて，膜の表裏が逆転した裏返り膜（inside out 膜）となる．裏返り膜は水性二層分配法で精製できる．また，チラコイド膜を高濃度の界面活性剤 Triton X-100 で処理し分画遠心すると，グラナチラコイドを単離できる．この標品は光化学系 II に富むことから，慣用的に光化学系 II 膜と呼ばれている．

2 種類の光化学系 II 膜単離法がほぼ同時期に開発された．相違点は Triton 処理の際共存させる陽イオンが 2 価（$Mg^{2+}$）[11] か 1 価（$Na^+ + K^+$）[12] かという点のみである．開発者の名前から，単離した標品はそれぞれ BBY 粒子，K&M（桑原・村田）粒子と呼ばれた．光化学系 II 複合体の単離を目指して開発された方法だったため「粒子」という名称が付けられたが，その後グラナ部分に相当する膜標品であることがわかり（文献 10）参照），光化学系 II 膜という名称に改められている．使用する陽イオンの種類によらず，得られる光化学系 II 膜の性質と組成はほぼ同じである．2 価イオンを用いるとグラナ構造の膜の接着が強まるため光化学系 II 膜の収率が高くなるが，光化学系 I が存在する margin 部分が混入しやすく，また膜どうしも凝集しやすい．一方，1 価カチオンを用いるとグラナの接着が弱く光化学系 I の混入も少ないが，光化学系 II 膜の収率が若干低い．筆者は，材料が大量に入手できるホウレンソウでは K&M 法を，コムギと

イネではBBY法を使っている．

[実験方法：桑原・村田の方法[12)]]

・破砕溶液：50 mM Na/K phosphate buffer (pH 7.4)，200 mM NaCl，0.1 M sucrose．
・チラコイド膜懸濁溶液（A液）：50 mM Na/K phosphate buffer(pH 6.9)，50 mM NaCl，0.3 M sucrose．
・20%（w/v）Triton X-100．
・光化学系II膜洗浄液（B液）：40 mM Na/K phosphate buffer（pH 6.9）．
・光化学系II膜懸濁液（C液）：25 mM MES-NaOH（pH 6.5），10 mM NaCl，0.3 M sucrose．

1．ホウレンソウ葉を破砕溶液で破砕，濾過し，3,000× $g$ で10分間遠心する．
2．沈殿を破砕溶液に懸濁し遠心する．500× $g$ に達したら遠心を停止する．
3．遠心上清を3,000× $g$ で10分間遠心し，チラコイド膜を沈殿させる．
4．沈殿をA液に懸濁し遠心する．500× $g$ に達したら遠心を停止する．
5．上清（チラコイド膜）を回収し，クロロフィル濃度を決定する．
6．A液で希釈してチラコイド膜懸濁液のクロロフィル濃度を2 mg/mLとする．
7．チラコイド膜懸濁液をビーカーに入れスターラーでゆっくり撹拌しながら，Tritonとクロロフィルの比が25：1（w/w）になるように20%（w/v）Triton溶液を滴下する．Triton溶液を滴下し終えたら約1分間撹拌を続ける．この処理は4 ℃以下の低温室内あるいはビーカーを氷に入れて行う．
8．1,000× $g$ で2分間遠心し，上清を回収する．
9．上清を35,000× $g$ で10分間遠心し，沈殿をB液に懸濁する．沈殿はねばねばしていて懸濁しにくい．B液を少しずつ加えながら沈殿が完全に分散されるまで懸濁する（塊がほぼ無くなってから筆で100回懸濁液をかき混ぜると完全に分散できる）．
10．1,000× $g$ で2分間遠心し，上清を回収する．
11．上清を35,000× $g$ で10分間遠心し，沈殿をC液に懸濁する．ステップ9同様，沈殿が完全に分散されるまで懸濁する．
12．遠心とC液への懸濁を3回繰り返す．

光化学系II膜の回収率は，チラコイド膜のクロロフィル量の20-40%である．回収率が低いときはTritonとクロロフィルの比を20：1（w/w）に下げる．原報ではステップ11の沈殿が光化学系II膜標品とされているが，この沈殿には高濃度のTritonが残っている．遠心と懸濁を最低3回繰り返して（ステップ12）Tritonを除去する．Tritonを除去した光化学系II膜は安定で，クロロフィル濃度2-4 mg/mL，0 ℃で遮光保存すれば少なくとも1日間酸素発生活性はまったく低下しない．

## 参考文献


1）加藤栄，宮地重遠，村田吉男，「光合成研究法」，共立出版，1981．
2）R. G. Jensen & J. A. Bassham, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **56** (1966) 1095.
3）W. Cockburn, D. A. Walker, & C. W. Baldry, *Plant Physiol.* **43** (1968) 1415.
4）H. Y. Nakatani & J. Barber, *Biochim. Biophys. Acta* **461** (1977) 510.
5）T. Takabe, M. Nishimura, & T. Akazawa, *Agric. Biol. Chem.* **43** (1979) 2137.
6）N. Mizusawa, N. Yamamoto, & M. Miyao, *J. Photochem. Photobiol. B. Biol.* **48** (1999) 97.
7）K. Cline, M. Werner-Washburne, J. Andrews, & K. Keegstra, *Plant Physiol.* **75** (1984) 675.
8）K. Keegstra & A. E. Yousif, *Methods Emzymol.* **118** (1986) 316.
9）K. Cline, J. Andrews, B. Marsey, E. H. Newcomb, & K. Keegstra, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **78** (1981) 3595.
10）宮尾光恵，蛋白質 核酸 酵素 別冊30号 (1987) 157.
11）D. A. Berthold, G. T. Babcock, & C. F. Yocum, *FEBS Lett.* **134** (1981) 231.
12）T. Kuwabara & N. Murata, *Plant Cell Physiol.* **23** (1982) 533.

# 2．光合成膜などの単離
## b．光合成細菌の光合成膜

原田　二朗[1)]，浅井　智広[2)]，大岡　宏造[2)]

紅色細菌から単離されるクロマトフォアは安定性が高く，光合成研究の歴史の中ではごく初期の頃から，光化学反応，電子伝達反応，リン酸化反応の機構を調べるために用いられてきた．一方，緑色硫黄細菌やヘリオバクテリは光化学反応系が非常に不安定であるため，比較的容易で迅速に調製できる膜標品を研究に用いる場合が多い．光合成膜は，アンテナ複合体や反応中心複合体をはじめ，膜タンパク質複合体を精製する際には必ず調製しなければならない．ここでは紅色細菌，緑色細菌，およびヘリオバクテリアの光合成膜標品の調製法について説明する．

## Preparations of membranes from anoxygenic photosynthetic bacteria.

Jiro Harada, Chihiro Azai, Hirozo Oh-oka

Photosynthetic membranes contain integrated protein complexes essential for energy conversion system. Reaction centers and their related electron transfer components reside in invaginated membranes in purple bacteria, while they do in cell membranes in green bacteria and heliobacteria. Procedures to isolate these membranes are described briefly in order to investigate photosynthetic activities and/or purify membrane-associated complexes followed by further studying their structures and functions in details.

### 2.b.1　紅色細菌

紅色細菌を光合成条件（嫌気光照射条件）にて培養を行うと，細胞内に様々な形状の膜を発達させる．*Rhodobacter*(*Rba.*) *sphaeroides*[1)]，*Rhodospirillum*(*Rsp.*) *rubrum*[2)]，*Allochromatium vinosum*[3)] には袋状の，*Rsp. molischianum*[4)] や *Rhodopseudomonas*(*Rps.*) *palustris*[5)] ではラメラ状の構造体が観察される．細胞破砕後に袋状の小胞膜 vesicle が得られるが，これを一般的にクロマトフォアと呼んでいる．ここで得られたクロマトフォアは，細胞膜に存在していたときと異なり，膜の内外が反転していることに注意すべきである（細胞質側を向いていた面が外側に来る）[6,7]．クロマトフォアの大きさは，約600 Åであり，膜の厚さは約 55 Åである[1)]．

#### 2.b.1.1　培養条件における光合成系の変化

紅色細菌の反応中心複合体は培養条件によって影響を受け，特に光強度によって大きく変化する[8,9]．図1は異なる光強度にて培養したとき，*Rba. sphaeroides* の細胞の可視吸収スペクトルの変化を示す．光強度が弱くなるにつれて，LH2 の極大吸収波長（B 850 と B 800）での吸収が増大する．またアンテナ複合体の種類や色素組成を変化させる紅色細菌も存在する[10,11]．*Rps. palustris* とその近縁種は強光のときは LH2 を，弱光のときは LH4 を合成し，同時に BChl *a* やカロテノイドの組成も変化することが報告されている[12,13]（図2参照）．それゆえ培養時の光強度を変化させることにより，目的に応じたクロマトフォアの調製が可能である．

#### 2.b.1.2　クロマトフォアの調製

クロマトフォアは，新しく培養した菌体から調製する

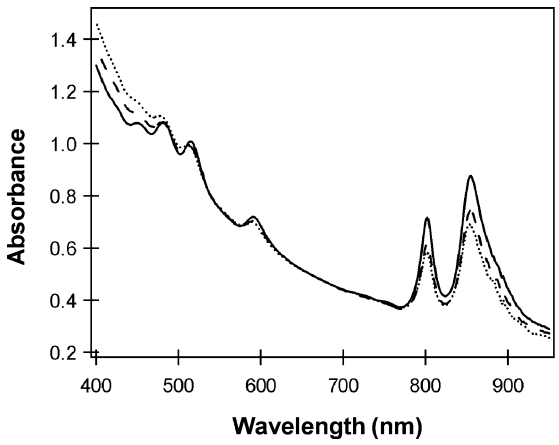



図1：*Rba. sphaeroides* の菌体の吸収スペクトル
異なる光強度にて培養した時の吸収スペクトルを示す．$OD_{660}$ を 0.5 に合わせて規格化した．実線：3 $\mu$E/sec/m²，破線：30 $\mu$E/sec/m²，点線：200 $\mu$E/sec/m²．

1）立命館大学理工学研究科
2）大阪大学大学院理学研究科生物科学専攻

ことが最も好ましい（菌体を凍結保存する場合には，緩衝液A（50 mM Tris-HCl (pH 7.8)，150 mM NaCl）で2回，洗浄しておくことを勧める）．調製時に用いる緩衝液はおもにTris-HCl緩衝液やリン酸緩衝液であるが，紅色細菌の種類や実験目的に応じて変える必要があり，過去の文献を参考にすべきである．クロマトフォアは内側に可溶性チトクロームを含む場合が多く，実験目的によっては不都合となる．菌体を10 mM EDTAを加えた緩衝液に懸濁して氷冷放置（1～2時間）し，EDTAを含まない緩衝液で洗浄することによりクロマトフォアからほぼ完全に除くことができる．

菌体を破砕する方法には，フレンチプレスと超音波処理がある．フレンチプレスによる破砕はクロマトフォアの収量が高く，おもにタンパク質精製に用いられる．超音波処理は少量の菌体からクロマトフォアを調製することができ，光化学反応や酵素活性を測定する場合に便利である．ここでは*Rps. palustris*からクロマトフォアを調製する方法を説明する．標品調製は4 °C（あるいは氷中）で行う．

**[手順]**

[1] 培養後，8,000×g，15分間の遠心で集菌する．1 Lの培養液から湿重量で10 g程度の菌体が得られる．*Rps. palustris*は培養時に水素ガスを発生するため，培養瓶を完全に培地で満たすと破損する危険がある．培養瓶の上層部に1/10程度の気層を空けておく必要がある．

[2] a．フレンチプレスによる破砕：菌体を約3倍量の緩衝液Aに懸濁する（懸濁液の粘性が高くて扱いにくい場合には，緩衝液にDNase (10 μg/ml) を添加する）．20000 psiでの処理を2回行う．

b．超音波処理による破砕：菌体を適当量の緩衝液Aに懸濁する．懸濁液を氷水で冷却しながら，超音波発生装置の最大出力（250 W，10 kHz）にて70～120秒間処理する（熱発生を極力抑えるために不連続な超音波処理を行うこと）．

[3] 破砕溶液を8,000×g，15分間遠心することにより未破砕細胞を除いた後，85,500×g，60分の超遠心により沈殿画分を回収する．沈殿画分を緩衝液Aで懸濁し，再度，85,500×g，60分の超遠心を行い，上清を除く．この作業を2回繰り返す．最後に沈殿画分を少量の緩衝液Aで懸濁し，クロマトフォア標品とする．この際，絵筆等を用いて塊を残さないように少しずつ沈殿を懸濁するとよい．膜タンパク質精製を目的とする場合には最初の超遠心後の沈殿画分を回収するだけで十分であり，次の可溶化過程に用いる．

図2には，*Rps. palustris*から調製したクロマトフォアの可視吸収スペクトルを示している．200 μE/sec/m² による培養では周辺アンテナ系のほとんどがLH2を形成しているが，光強度が下がるにつれてLH4の比率が多くなる．得られたクロマトフォア標品のバクテリオクロロフィル *a* の濃度は，アセトン/メタノール混合液(7/2, v/v) にて抽出後，吸収スペクトルにて定量する（$\varepsilon_{772}$ = 75 $mM^{-1}\cdot cm^{-1}$）．クロマトフォアを凍結保存する時は，融解後にクロマトフォアが凝集するのを避けるために10%のショ糖を緩衝液に加えておく．また遮光して氷中保存した場合，*Rsp. rubrum*の光リン酸化活性を例としたとき，1ヶ月以上安定であることが報告されている．

## 2.b.2 緑色細菌

緑色細菌は緑色イオウ細菌と緑色糸状性細菌（非イオウ細菌）からなり，両者は系統的には大きく離れた二つのグループである．紅色細菌に見られるような発達した膜系をもたず，光合成反応中心は細胞膜に存在する．反応中心の種類や電子伝達系など，生化学的，生理学的に両者は大きく異なるが，クロロゾームという巨大な膜外アンテナ系をもつ点で共通している[14]．

緑色細菌から純度の高い光合成膜標品を調製するためには，クロロゾームを除く必要がある．細胞破砕後の膜画分から，ショ糖密度勾配超遠心法によりクロロゾームが脱離した光合成膜の調製が可能である[15]．本項では，好熱性の緑色硫黄細菌*Chlorobaculum tepidum*（*syn.*

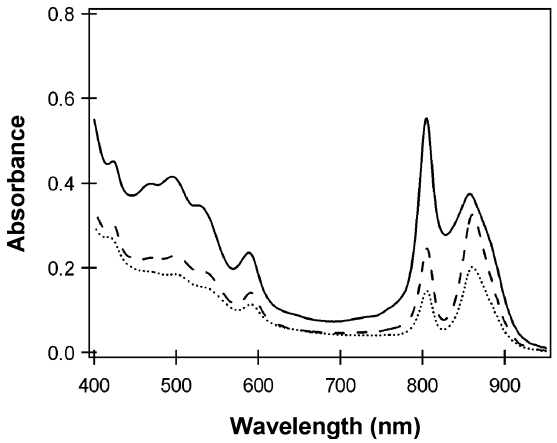



**図2**：*Rps. palustris*のクロマトフォアの吸収スペクトル
異なる光強度にて培養後，調製したクロマトフォアのスペクトルを示す．クロマトフォアのタンパク質濃度を30 μg/mlに合わせている．実線：3 μE/sec/m²，破線：30 μE/sec/m²，点線：200 μE/sec/m²．

*Chlorobium tepidum*）からの光反応活性を保持した光合成膜標品の調製を具体例として紹介する[16]．同様の方法で，*Chlorobaculum thiosulfatiphilium*（*syn. Chlorobium limicola* f. *thiosulfatophilum*），*Chlorobaculum parvum*（*syn. Chlorobium vibrioforme* NCIB 8327）の膜標品の調製が報告されている[17,18]．また，弱光で培養した緑色糸状性細菌 *Chloroflexus aurantiacus* でも同様の方法を用いた調製例がある[19]．しかし，より強光で *Chloroflexus aurantiacus* を培養した場合にはクロロゾームが脱離しにくくなるため，ヨウ化ナトリムのようなカオトロピックイオンを少量加えて調製する方法が報告されている[20,21]．

### 2.b.2.1　光合成膜の調製

緑色硫黄細菌は絶対嫌気性の細菌で，反応中心をはじめとする光合成装置は極度に酸素に不安定なため，調製には嫌気的手法を用いる．下記手順において，ショ糖密度勾配遠心後は嫌気グローブボックス内で操作しなければならない．緑色硫黄細菌のクロロゾームは酸素存在下では吸収した光を消光する[22,23]．それゆえクロロゾームを除去するまでは発生した酸素ラジカルは容易に除去され，光合成膜の光反応活性は安定に保持されている．使用する緩衝液類は脱気・窒素ガス交換後，嫌気グローブボックス内で一晩以上放置して溶存酸素を十分に除き，調製当日に適当な還元剤を加えて使用する．遠心中は直接酸素に触れないようにキャップ付遠心管を用いるか，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．緑色糸状性細菌の光合成活性は酸素に対して寛容であり[14]，嫌気操作を行う必要はない．また操作は可能限り冷暗所で行うように努める．

**[準備する緩衝液]**

- 緩衝液A：50 mM Tris-HCl(pH 8.0)，1 mM EDTA，10 mM L-cysteine
- 緩衝液B：50 mM Tris-HCl(pH 8.0)，1 mM EDTA，2 mM DTT，20 mM $\beta$-D-glucose，glucose oxidase（2 U/ml），catalase（20 U/ml）
- 緩衝液C：50 mM Tris-HCl(pH 8.0)，1 mM EDTA，2 mM DTT
- 50%ショ糖緩衝液：50 mM Tris-HCl(pH 8.0)，1 mM EDTA，10 mM L-cysteine，50%ショ糖（w/v）

**[手順]**

培養後，12,000×$g$，10 分の遠心により集菌する．約 10 L の培養液から，湿重量で 10–15 g の菌体が得られる．菌体 10 g（湿重量）あたり 20–30 ml の緩衝液Aに懸濁後，フレンチプレス（20,000 psi）に 3 回通すことにより細胞を破砕する．23,500×$g$，20 分間の遠心により未破砕細胞や元素イオウを除き，40,000×g，60 分間の遠心により大きな膜断片を除く．2 回目の遠心後に回収された上清中には，クロロゾームと光合成膜，および可溶性タンパク質が含まれている．上清をショ糖密度勾配（40，42.5，45，47.5，50%（w/v）の段階勾配．嫌気グローブボックス内において緩衝液Aと 50%ショ糖緩衝液を用いて準備する）にロードし，200,000×$g$ で 17–19 時間の超遠心後，45%ショ糖付近にある淡緑色の層を光合成膜画分として回収する（図 3）．すぐ上層にある濃緑色の層は，おもに脱離したクロロゾームである．回収した光合成膜画分はバイアル瓶に移して脱気・窒素ガス交換後，嫌気グローブボックス内に持ち込む．緩衝液Bで約 4 倍に希釈した後，室温で 15 分間穏やかに撹拌する（緩衝液Bに含まれる Glucose oxidase/Catalase により溶存酸素は除去される）．最後に 160,000×$g$，60 分間の遠心により沈殿画分を回収し，少量の緩衝液Cに懸濁して光合成膜標品とする．約 10 L の培養液から，$OD_{810}$＝50–100 の標品が 100–200 $\mu$l 得られる．

図 4 は *Chl. tepidum* から調製した光合成膜標品の吸収スペクトルである．比較のために細胞懸濁液，粗精製膜標品の吸収スペクトルも示している．緑色硫黄細菌の光合成膜は，反応中心複合体のアンテナ色素である BChl *a* に由来する 810 nm の吸収ピークをもつ．標品の純度は，ショ糖密度勾配遠心後，いかにクロロゾームの層を採らずに膜画分を回収できるかで決まる．クロロゾームが混入した場合，図 2 の粗精製膜標品の吸収スペクトルで見られるような，750 nm 付近に比較的大きな吸収ピークが現れる．しかしほとんどのクロロゾームは，既に光合成反応中心複合体から脱離しているため光反応

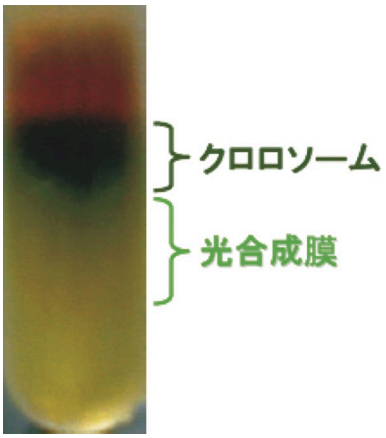



**図 3**：*Chl. tepidum* の光合成膜調製時のショ糖密度勾配遠心

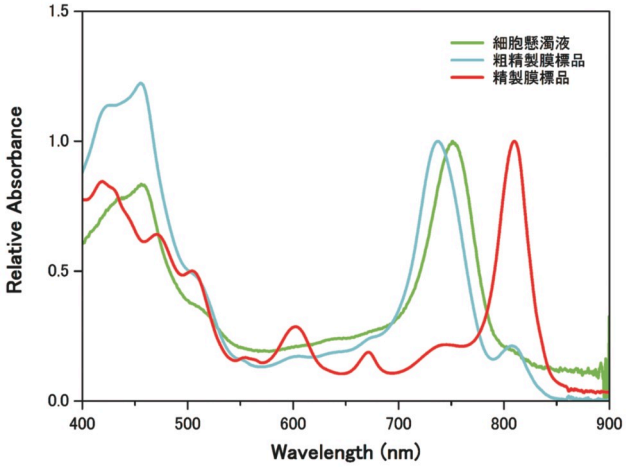



図 4：*Chl. tepidum* の光合成膜標品の吸収スペクトル．
緑線：細胞懸濁液（Cell suspension），青線：粗精製膜標品（Crude membrane），赤線：光合成膜標品（Purified membrane）．各標品は長波長側の吸収ピークで規格化して示した．粗精製膜標品は，細胞破砕後，110,000×*g*，1 時間の超遠心により得られた沈殿画分を緩衝液 C に懸濁したものである．

には寄与せず，クロロゾームの蛍光や夾雑物などが目的の実験に影響しない程度の混入であれば問題ない．

## 2.b.3　ヘリオバクテリアからの光合成膜の調製

ヘリオバクテリアも絶対嫌気性の光合成細菌であり，酸素に対して非常に不安定な光合成膜調製のためには嫌気的手法が必要である[24]．しかし紅色細菌がもつようなアンテナ複合体 LH1/LH2 や緑色細菌のクロロゾームのような巨大アンテナ系を持たない．複雑に発達した内膜系をもたず，光合成反応中心は細胞膜のみに存在する．それゆえ細胞膜標品の調製は簡便であり，培養液 1 L から得られた湿重量 1–2 g 程度の菌体から，光化学反応の活性測定に必要な量を調製することができる．

### [手順]

湿重量 1–2 g の菌体に対し 5–6 ml の緩衝液（50 mM Tris-HCl（pH 8.0），2 mM DTT，1 mM EDTA）に懸濁後，菌体をフレンチプレス（20,000 psi，3 回）で破砕する．12,000×g，10 min の遠心で未破砕細胞を除き，180,000×g，60 min の超遠心により細胞膜画分を得る．使用する緩衝液は嫌気的に調製する必要があり，菌体破砕や遠心操作以外は嫌気グローブボックス内で行う．

## 文献

1）G. Cohen-Bazire, Bacterial Photosynthesis, ed. H. Gest, A. S. PietroL & P. Vernon, Yellow Springs, Artioch Press, 1963
2）T. Oda & T. Horio, Exp Cell Res **34** (1964) P.414.
3）J. A. Bergeron, Brookhaven Symp. Biol. **11** (1958) P. 118.
4）G. Drews, Arch. Mikrobiol. **36** (1960) P.99.
5）G. Cohen-Bazire & W. R. Sistrom, The Chlorophylls, ed. L. P. VernonG & R. Seely, New York, Academic Press, 1963
6）R. C. Prince, A. Baccarini-Melandri, G. A. Hauska, B. A. Melandri & A. R. Crofts Biochim. Biophys. Acta **387** (1975) P.212.
7）A. Hochman, I. Fridberg & C. Carmeli, Eur. J. Biochem. **58** (1975) P.65.
8）W. R. Sistrom, Control of Antenna Pigment Components: The Photosynthetic Bacteria, ed. R. K. Clayton & W. R. Sistrom, New York, Plenum, 1978, p.841.
9）M. Itoh, K. Matsuura, K. Shimada & T. Satoh, Biochem. Biophys. Acta **936** (1988) P.332.
10）A. Hiraishi, Int. J. Syst. Bacteriol. **47** (1997) P.217.
11）M. B. Evans, A. M. Hawthornthwaite & R. J. Cogdell, Biochim. Biophys. Acta **1016** (1990) P.71.
12）J. Harada, T. Mizoguchi, S. Yoshida, M. Isaji, H. Oh-oka & H. Tamiaki, Photosynth. Res. **95** (2008) P.213
13）T. Mizoguchi, M. Isaji, J. Harada & H. Tamiaki, Photochem. Photobiol. Sci. **7** (2008) P.492.
14）N. U. Frigaard & D. A. Bryant, Arch. Microbiol. **182** (2004) P.265.
15）K. Schmidt, Arch. Microbiol. **124** (1980) P.21.
16）H. Oh-oka, M. Iwaki & S. Itoh, Biochemistry **37** (1998) P.12293.
17）U. Feiler, W. Nitschke & H. Michel, Biochemistry **31** (1992) P.2608.
18）B. Kjaer, N. U. Frigaard, F. Yang, B. Zybailov, M. Miller, J. H. Golbeck & H. V. Scheller, Biochemistry **37** (1998) P.3237.
19）P. van Vliet, D. Zannoni, W. Nitschke & A. W. Rutherford, Eur. J. Biochem. **199** (1991) P.317.
20）R. G. Feick, M. Fitzpatrick & R. C. Fuller, J. Bacteriol. **150** (1982) P.905.
21）R. G. Feick & R. C. Fuller, Biochemistry **23** (1984) P. 3693.
22）N. U. Frigaard & K. Matsuura, Biochim. Biophys. Acta. **1412** (1999) P.108.
23）M. F. Hohmann-Marriott & R. E. Blankenship, Biochim. Biophys. Acta. **1767** (2007) P.106.
24）H. Oh-oka, Photochem. Photobiol. **83** (2007) P.177

# 3．酵素・電子伝達成分の精製・活性測定・定量
## a．カルビン回路の酵素

田茂井政宏[1)]，重岡　　成[1)]

カルビン回路は光合成炭素固定の初期経路であり，チラコイド膜上で生成されたATPとNADPHを用いて，$CO_2$を固定し，糖に還元する．高等植物のカルビン回路で機能する酵素群はフェレドキシン／チオレドキシン（Fd/Trx）系をはじめとする複雑な制御系により厳密な活性調節を受けているが，ラン藻および一部の藻類では植物と異なることも明らかになっている[1)]．本章では，カルビン回路の主な酵素活性測定方法について紹介する．

## Enzymes for Calvin Cycle

Masahiro Tamoi, Shigeru Shigeoka

### 3.a.1　カルビン回路

カルビン回路は光合成炭素固定の初期経路であり，葉緑体に含まれる11種類の酵素による13の反応で構成されており，大きく以下の3つの段階に分けられる（図1）．第1段階はカルボキシル化過程で，リブロース-1,5-ビスリン酸カルボキシラーゼ／オキシゲナーゼ（Rubisco）により3分子の$CO_2$が3分子のリブロース-1,5-ビスリン酸（RuBP）に固定され，6分子の3-ホスホグリセリン酸（PGA）が生じる．第2段階はPGAの還元過程で，生成したPGAは光化学系に由来するATPとNADPHでリン酸化・還元され，6分子のトリオースリン酸（ジヒドロキシアセトンリン酸：DHAPおよびグリセルアルデヒド3リン酸：GAP）に変換される．第3段階はRuBPの再生過程で，一連の反応でRuBPが再生される．この回路において，トリオースリン酸は鍵となる中間体であり，5分子のトリオースリン酸から3分子のリブロース-5-リン酸（Ru5P）が再生され，1分子は葉緑体内でのデンプン合成もしくは細胞質でのショ糖合成へと分配される．したがって，カルビン回路でのRuBP再生に利用するためのトリオースリン酸が枯渇しないように，デンプン・ショ糖合成系への転出とのバランスを維持することが葉緑体内での炭素代謝では特に重要である．このバランスを維持するために，カルビン回路のいくつかの酵素群は厳密な制御を受けている．主な調節機構として，光還元力を利用したフェレドキシン／チオレドキシン（Fd/Trx）系がある．フルクトース-1,6-ビスホスファターゼ（FBPase），グリセルアルデヒド－3－リン酸デヒドロゲナーゼ（GAPDH），ホスホリブロキナーゼ（PRK），セドヘプツロース-1,7-ビスホスファターゼ（SBPase）の分子内に存在する2つのシステイン残基が，光照射下ではFd/Trx系を介した光還元力を利用して還元されて活性型となり，暗黒下では酸化されてジスルフィド結合を形成し不活性型となる．さらにカルビン回路は，他の酵素群の特性に基づいて厳密な制御を受けており，それぞれの酵素学的特性からの調節機構については詳細に検討されている[1,2)]．

1）近畿大学農学部バイオサイエンス学科

### 3.a.2　リブロース-1,5-ビスリン酸カルボキシラーゼ／オキシゲナーゼ（Rubisco）活性測定法

Rubisco（EC 4.1.1.39）はRuBPに$CO_2$を固定し2分子の3-ホスホグリセリン酸を生成する反応を触媒する．Rubisco本来の生理学的な役割はRuBPへのカルボキシル化（カルボキシラーゼ反応）であるため，リブロース-1,5-ビスリン酸カルボキシラーゼが正しい呼称であるが，$CO_2$の代わりに$O_2$を固定する反応（オキシゲナーゼ反応）も行うことから，リブロース1,5-ビスリン酸カルボキシラーゼ／オキシゲナーゼと呼称される．Rubiscoの反応において，カルボキシラーゼ反応は$O_2$によって，オキシゲナーゼ反応は$CO_2$によって拮抗的に阻害される．したがって，触媒部位近傍の溶存基質濃度をそれぞれ$[CO_2]$，$[O_2]$，カルボキシラーゼ反応とオキシゲナーゼ反応の最大速度をそれぞれ$V_{cmax}$，$V_{omax}$，溶存基質に対するミカエリス定数をそれぞれ$K_c$，$K_o$とすると，カルボキシラーゼ反応の速度（$V_c$）とオキシゲナーゼ反応の速度（$V_o$）は次式で表すことが出来る[3)]．

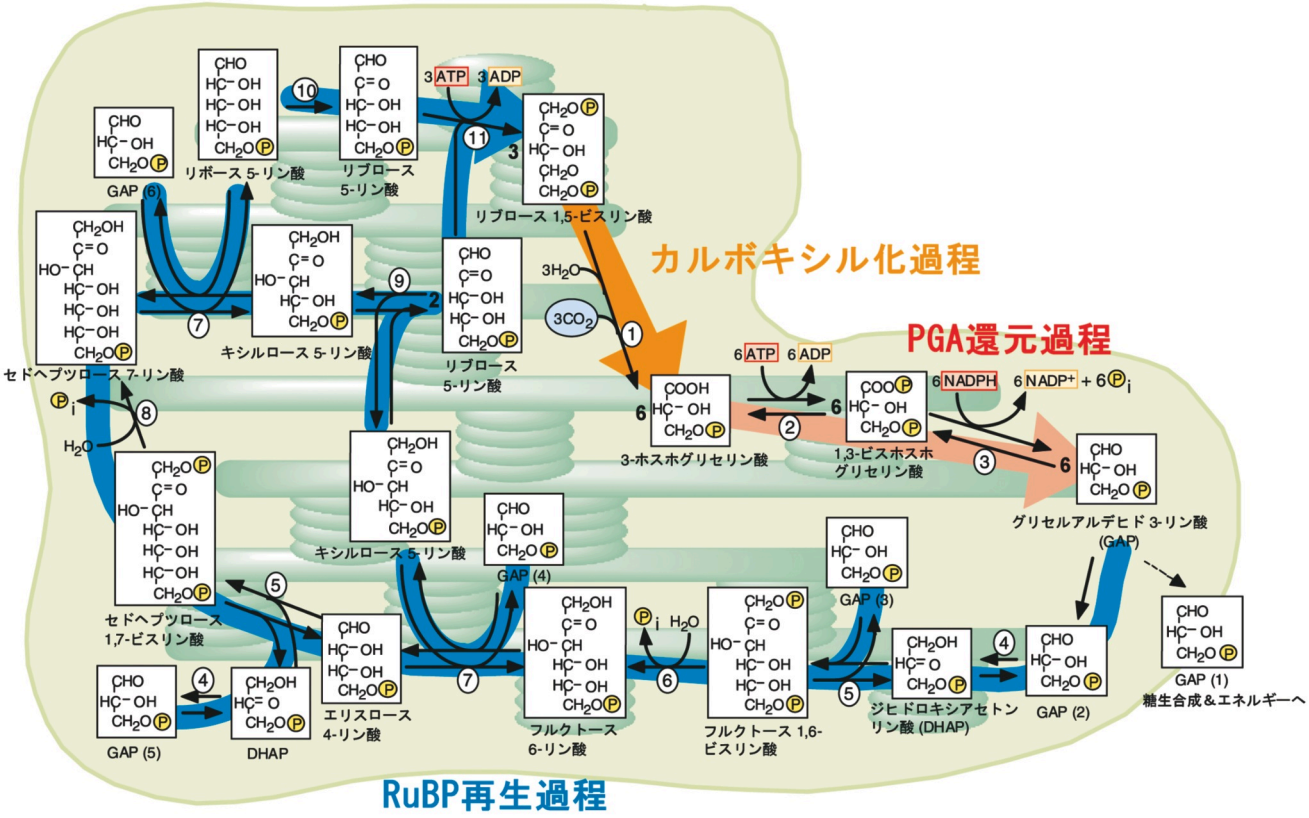



図1：カルビン回路
(1)リブロース-1,5-ビスリン酸カルボキシラーゼ／オキシゲナーゼ（Rubisco），(2)ホスホグリセリン酸キナーゼ，(3)グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ(GAPDH)，(4)トリオースリン酸イソメラーゼ，(5)アルドラーゼ，(6)フルクトース-1,6-ビスホスファターゼ（FBPase），(7)トランスケトラーゼ，(8)セドヘプツロース-1,7-ビスホスファターゼ(SBPase)，(9)リブロース-5-リン酸エピメラーゼ，(10)リボース-5-リン酸イソメラーゼ，(11)ホスホリブロキナーゼ（PRK）

$$V_c/V_o=(V_{cmax}/K_c)/(V_{omax}/K_o)\cdot[CO_2]/[O_2]$$

$V_{cmax}/K_c$ はカルボキシラーゼ反応の反応特異性，$V_{omax}/K_o$ はオキシゲナーゼ反応の反応特異性を示す．この式から Rubisco の両反応の特異性の比$(V_{cmax}/K_c)/(V_{omax}/K_o)$，すなわち反応特異性（relative specificity：$S_{c/o}$ または $\tau$）を示す次式が導かれる．

$$S_{c/o}=V_c\cdot[O_2]/V_o\cdot[CO_2]=V_{cmax}\cdot K_o/V_{omax}\cdot K_c$$

$S_{c/o}$ が高いほどカルボキシラーゼ反応を好むことを意味する．高等植物の Rubisco では 60～130，緑藻の Rubisco では 60～65，ラン藻の Rubisco では 40 前後である[3]．空気と平衡にある水中の溶存 $CO_2$ と $O_2$ 濃度はそれぞれ 11 $\mu$M，256 $\mu$M である．この条件では 95 の $S_{c/o}$ をもつ高等植物の Rubisco では，カルボキシラーゼ反応がオキシゲナーゼ反応の 4.1 倍の速度で進行することになる．一方，40 の $S_{c/o}$ をもつラン藻の Rubisco では，その値は 1.7 倍となる．

活性測定は，反応生成物である PGA の増加量を，PGA キナーゼおよび NAD-GAPDH とのカップリング反応による NADH の減少量として，チャートスピード 15 mm/min，レンジ 0.4(20 mV)，27℃における 340 nm の吸光度変化により測定する[4]．NADH の 340 nm における分子吸光係数 $\varepsilon$ は 6220 $M^{-1}cm^{-1}$ とする．

[実験方法]

1．植物組織（1~2 g wt）に 5 ml の 100 mM Tris-HCl (pH 7.8)，1 mM EDTA，5 mM DTT，5 mM $MgCl_2$，1％ Triton X-100 を加え，海砂，PVP をスパチュラに 1 杯ずつ加えた後に乳鉢，乳棒で破砕する．

2．破砕液を遠沈管に移して 12,000× $g$，4 ℃で 10 分間遠心分離後，上清を新しい試験管に移す．

3．1 ml セル 2 つに反応系 [50 mM HEPES-KOH (pH 8.0)，15 mM $MgCl_2$，1 mM EDTA，20 mM NaCl，10 mM DTT，0.5 mM ATP，0.2 mM NADH，5 mM ホスホエノールピルビン酸 (PEP)，5 mM リン酸クレアチン，10 mM $NaHCO_3$，20 unit

ピルビン酸キナーゼ（PK），2 unit クレアチンホスホキナーゼ，18 unit NAD-GAPDH，18 unit PGA キナーゼ]をそれぞれ 1 ml ずつ加え，両方に粗酵素液（10~50 $\mu$l）を加えて撹拌する．

4．W ビームのセルホルダーにそれぞれセットし，27°C，吸光度 340 nm の条件で約 2 分間ベースラインを引く．

5．片方のセルにのみ 1 mM RuBP を加えて素早く撹拌し，反応開始とする．340 nm の吸光度変化を経時的に測定する（約 10 分間）．

6．上記実験条件で得られたデータから NADH 減少速度を計算し，Rubisco 活性とする．

7．活性化状態の活性を測定する場合は，粗酵素に 20 mM $MgCl_2$, 10 mM $NaHCO_3$ を加えて氷上で 10 分間インキュベートした後に，上記 3~6 の方法で Rubisco 活性の測定を行う．

## 3.a.3 グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ（GAPDH）活性測定法

GAPDH（EC 1.2.1.9）は 1,3-ビスホスホグリセリン酸（DPGA）←→ GAP の反応を可逆的に触媒する酵素であり，高等植物には葉緑体と細胞質に局在している．葉緑体型 GAPDH は NADP (H)および NAD (H)のいずれも利用し，$NADP^+$−GAPDH と表される．一方，細胞質型 GAPDH は NAD (H)のみを利用することから，$NAD^+$−GAPDH と表される．葉緑体型 GAPDH はカルビン回路で機能しており，Fd/Trx 系を介した酸化還元により活性調節を受ける．細胞質型 GAPDH はショ糖合成系（解糖系）で機能しており，酸化還元による活性調節を受けない．活性測定の際に NADPH を用いることにより，葉緑体型 GAPDH のみを測定することが可能である．活性の測定には W ビーム分光光度計を用い，NADPH の減少量を，チャートスピード 15 mm/min，レンジ 0.4 (20 mV)，27°C における 340 nm の吸光度変化により測定する[5]．また，基質である DPGA が非常に高価である（入手しにくい）ため，PGA を PGA キナーゼによって DPGA に変換する反応をカップルさせて測定する．NADPH の 340 nm における分子吸光係数 $\varepsilon$ は 6220 $M^{-1}cm^{-1}$ とする．

**[実験方法]**

1．植物組織（1~2 g wt）に 5 ml の 100 mM Tris-HCl (pH 8.0)，10 mM $MgCl_2$，1 mM EDTA，1 mM GSH，2.5 mM DTT（細胞内活性化率を測定する場合は GSH，DTT を除く），1 % Triton X-100 を加え，海砂，PVP をスパチュラに 1 杯ずつ加えた後に乳鉢，乳棒で破砕する．

2．破砕液を遠沈管に移して 12,000× $g$，4 °C で 10 分間遠心分離後，上清を新しい試験管に移す．（細胞内活性化率を測定する場合は，$N_2$ 置換すること）

3．1 ml セル 2 つに反応系［100 mM Tris-HCl (pH 8.0)，10 mM $MgCl_2$，5 mM ATP，0.2 mM NADPH，10 mM GSH，2 unit PGA キナーゼ］をそれぞれ 1 ml ずつ加え，両方に粗酵素液(10~50 $\mu$l)を加えて撹拌する．（$NAD^+$−GAPDH 活性を測定する場合は，NADPH の代わりに NADH を加える．）

4．W ビームのセルホルダーにそれぞれセットし，27°C，吸光度 340 nm の条件で約 2 分間ベースラインを引く．

5．片方のセルにのみ 3 mM PGA を加えて素早く撹拌し，反応開始とする．340 nm の吸光度変化を経時的に測定する（約 10 分間）．

6．上記実験条件で得られたデータから NADPH 減少速度を計算し，GAPDH 活性とする．

7．活性化状態の活性を測定する場合は，粗酵素液に 20 mM DTT を加えて氷上で 30 分間インキュベートした後に，上記 3~6 の方法で GAPDH 活性の測定を行う．

## 3.a.4 フルクトース-1,6-ビスリン酸アルドラーゼ（FBA）活性測定法

FBA (EC 4.1.2.13) は DHAP+GAP ←→フルクトース-1,6-ビスリン酸（FBP）FBP の反応を可逆的に触媒する酵素であり，高等植物には葉緑体と細胞質に局在している．FBA はその酵素学的性質から，反応に金属イオンを必要としないクラス I-FBA (CI-FBA) と，反応に金属イオンを必要とするクラス II-FBA (CII-FBA) とに分類される．真核光合成生物の葉緑体には CI-FBA のみが存在するのに対し，細胞質には CI-FBA と CII-FBA の両方が存在する．ラン藻（*Synechocystis* PCC6803）には CI-FBA と CII-FBA の両方が存在することが報告されている[6]．FBA 活性の測定は，FBP → DHAP+GAP の反応生成物である GAP 生成量を，トリオースリン酸イソメラーゼ（TP イソメラーゼ）およびグリセロール-3-リン酸デヒドロゲナーゼとのカップリング反応による NADH の減少量として，チャートスピード 15 mm/min，レンジ 0.4 (20 mV)，27°C における 340 nm の吸光

度変化により測定する[7]．NADH の 340 nm における分子吸光係数 $\varepsilon$ は 6220 $M^{-1}cm^{-1}$ とする．

[実験方法]

1．植物組織（1~2 g wt）に 5 ml の 100 mM Tris-HCl（pH 8.0），5 mM $MgCl_2$，1 mM EDTA，50 mM KCl，3 mM DTT，1％ Triton X-100 を加え，海砂，PVP をスパチュラに 1 杯ずつ加えた後に乳鉢，乳棒で破砕する．
2．破砕液を遠沈管に移して 12,000× $g$，4 ℃で 10 分間遠心分離後，上清を新しい試験管に移す
3．1 ml セル 2 つに反応系[50 mM Tris-HCl（pH 8.5），5 mM $MgCl_2$，0.15 mM NADH，5 unit TP イソメラーゼ，2 unit グリセロール-3-リン酸デヒドロゲナーゼ] をそれぞれ 1 ml ずつ加え，両方に粗酵素液（10~50 $\mu$l）を加えて撹拌する．
4．W ビームのセルホルダーにそれぞれセットし，27℃，吸光度 340 nm の条件で約 2 分間ベースラインを引く．
5．片方のセルにのみ 2 mM F6P を加えて素早く撹拌し，反応開始とする．340 nm の吸光度変化を経時的に測定する（約 5 分間）．
6．上記実験条件で得られたデータから NADH 減少速度を計算し，アルドラーゼ活性とする．
7．CI-FBA は上記方法で測定できるが，CII-FBA を測定する場合は 5 mM $MgCl_2$ の代わりに 0.2 mM $CoCl_2$ を加え，反応系の pH を 7.5 にして同様に測定する．

## 3.a.5 フルクトース 1,6-ビスホスファターゼ（FBPase）活性測定法

FBPase（EC 3.1.3.11）は，FBP をフルクトース-6-リン酸（F6P）と無機リン酸に加水分解する反応を触媒する酵素であり，高等植物には葉緑体型と細胞質型の 2 種類のアイソザイムとして存在している．葉緑体型 FBPase はカルビン回路で機能しており，Fd/Trx 系を介した酸化還元により活性調節を受ける．細胞質型 FBPase はショ糖合成系で機能しており，酸化還元による活性調節を受けず，AMP およびフルクトース-2,6-ビスリン酸（F2, 6-$P_2$）による阻害を受ける．これらの性質を利用することにより，葉緑体型と細胞質型の FBPase を分別測定することも可能である．活性の測定にはWビーム分光光度計を用い，グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ（G6PDH），ホスホグルコースイソメラーゼ（GP イソメラーゼ）とのカップリング反応による NADPH の増加量を，チャートスピード 15 mm/min，レンジ 0.4（20 mV），27℃における 340 nm の吸光度変化により測定する[8]．NADPH の 340 nm における分子吸光係数 $\varepsilon$ は 6220 $M^{-1}cm^{-1}$ とする．

[実験方法]

1．植物組織（1~2 g wt）に 5 ml の 100 mM Tris-HCl（pH 8.0），10 mM $MgCl_2$，1 mM EDTA，1 mM GSH，2.5 mM DTT（細胞内活性化率を測定する場合は GSH，DTT を除く），1％ Triton X-100 を加え，海砂，PVP をスパチュラに 1 杯ずつ加えた後に乳鉢，乳棒で破砕する．
2．破砕液を遠沈管に移して 12,000× $g$，4 ℃で 10 分間遠心分離後，上清を新しい試験管に移す．（細胞内活性化率を測定する場合は，$N_2$ 置換すること．）
3．1 ml セル 2 つに反応系［100 mM Tris-HCl（pH 8.0），10 mM $MgCl_2$，1 mM EDTA，0.4 mM $NADP^+$，0.5 unit G6PDH，1.5 unit GP イソメラーゼ］をそれぞれ 1 ml ずつ加え，両方に粗酵素液（10~50 $\mu$l）を加えて撹拌する．
4．W ビームのセルホルダーにそれぞれセットし，27℃，吸光度 340 nm の条件で約 2 分間ベースラインを引く．
5．片方のセルにのみ 200 $\mu$M FBP を加えて素早く撹拌し，反応開始とする．340 nm の吸光度変化を経時的に測定する（約 10 分間）．
6．上記実験条件で得られたデータから NADPH 増加速度を計算し，FBPase 活性とする．
7．活性化状態の活性を測定する場合は，粗酵素に 20 mM になるように DTT を加えて氷上で 30 分間インキュベートした後に，上記 3~6 の方法で FBPase 活性の測定を行う．

## 3.a.6 トランスケトラーゼ活性測定法

トランスケトラーゼ（EC 2.2.1.1）は F6P＋GAP ←→ キシルロース-5-リン酸(X5P)＋エリスロース-4-リン酸（E4P）（もしくはセドヘプツロース-7-リン酸（S7P）＋GAP ←→ X5P＋リボース-5-リン酸（R5P））の反応を可逆的に触媒する酵素で，活性の測定は X7P＋E4P → F6P＋GAP の反応生成物である GAP 生成量を，TP イソメラーゼおよびグリセロール-3-リン酸デヒドロゲナーゼとのカップリング反応による NADH の減少量として，チャートスピード 15 mm/min，レンジ 0.4（20

mV)，27℃における340 nmの吸光度変化により測定する[9]．NADHの340 nmにおける分子吸光係数εは6220 $M^{-1}cm^{-1}$とする．

[実験方法]

1．植物組織（1~2 g wt）に5 mlの100 mM Tris-HCl (pH 8.0)，5 mM $MgCl_2$，1 mM EDTA，50 mM KCl，3 mM DTT，1％ Triton X-100を加え，海砂，PVPをスパチュラに1杯ずつ加えた後に乳鉢，乳棒で破砕する．
2．破砕液を遠沈管に移して12,000× $g$，4 ℃で10分間遠心分離後，上清を新しい試験管に移す．
3．1 mlセル2つに反応系［100 mM HEPES-KOH (pH 7.5)，12 mM $MgC_{12}$，0.15 mM NADH，0.2 mM チアミンピロリン酸，0.8 mM X5P，0.8 mM E4P，5 unit TPイソメラーゼ，2 unitグリセロール-3-リン酸デヒドロゲナーゼ］をそれぞれ1 mlずつ加え，両方に粗酵素液(10~50 μl)を加えて撹拌する．
4．Wビームのセルホルダーにそれぞれセットし，27℃，吸光度340 nmの条件で約2分間ベースラインを引く．
5．片方のセルにのみ0.8 mM X5Pを加えて素早く撹拌し，反応開始とする．340 nmの吸光度変化を経時的に測定する（約10分間）．

## 3.a.7 セドヘプツロース-1,7-ビスホスファターゼ（SBPase）活性測定法

SBPase (EC 3.1.3.37) はセドヘプツロース-1,7-ビスリン酸（SBP）をS7Pと無機リン酸に加水分解する反応を触媒する酵素であり，Fd/Trx系を介した酸化還元により活性調節を受ける．活性測定はホスホフルクトキナーゼ（PFK），PK，乳酸デヒドロゲナーゼ（LDH）とのカップリング反応によるNADHの減少量を，チャートスピード30 cm/hr，レンジ0.4(20 mV)，27℃における340 nmの吸光度変化により測定する方法と[10]，SBPase反応により生じるリン酸を定量する方法[11]がある．

[実験方法（カップリング反応による活性測定法)]

1．植物組織（1~2 g wt）に5 mlの100 mM Tris-HCl (pH 8.0)，10 mM $MgCl_2$，1 mM EDTA，1 mM GSH，2.5 mM DTT(細胞内活性化率を測定する場合はGSH，DTTを除く)，1％ Triton X-100を加え，海砂，PVPをスパチュラに1杯ずつ加えた後に乳鉢，乳棒で破砕する．
2．破砕液を遠沈管に移して12,000× $g$，4 ℃で10分間遠心分離後，上清を新しい試験管に移す．(細胞内活性化率を測定する場合は，$N_2$置換すること)
3．1 mlセル2つに反応系［100 mM Tris-HCl (pH 8.0)，10 mM $MgCl_2$，20 mM KCl，0.1 mM ATP, 1 mM PEP, 0.15 mM NADH, 20 mM DTT，2 unit PK，2 unit LDH，0.5 unit PFK］をそれぞれ1 mlずつ加え，両方に粗酵素液（10~50 μl）を加えて撹拌する．(initial activityを測定する場合はDTTを除く.)
4．Wビームのセルホルダーにそれぞれセットし，27℃，吸光度340 nmの条件で約2分間ベースラインを引く．
5．片方のセルにのみ400 μM SBPを加えて素早く撹拌し，反応開始とする．340 nmの吸光度変化を経時的に測定する（約20分間）．
6．上記実験条件で得られたデータからNADH減少速度を計算し，SBPase活性とする．
7．活性化状態の活性を測定する場合は，粗酵素液に20 mM DTTを加えて氷上で30分間インキュベートした後に，上記3~6の方法でGAPDH活性の測定を行う．

[実験方法（リン酸定量による活性測定法)]

1．A溶液(50 mM Tris-HCl，pH 8.2，15 mM $MgCl_2$，1.5 mM $MgCl_2$）およびB溶液（50 mM Tris-HCl，pH 8.2，15 mM $MgCl_2$，1.5 mM $MgCl_2$，10 mM DTT，1 mM SBP)］および粗酵素液を以下のように混合し，27℃で5分間インキュベートする．
コントロール：A溶液（80 μl-粗酵素液量），B溶液（66 μl）
リファレンス：A溶液（80 μl-粗酵素液量），B溶液（66 μl），粗酵素液（10~20 μl）
2．反応終了後急冷し，完全に反応を止めるため，6％(v/v)過塩素酸をすべてのチューブに50 μl加える．
3．コントロールには粗酵素液をリファレンスと同量加える．
4．沈殿が多い場合には12,000× $g$，4 ℃で10分間遠心分離後，上清を新しい試験管に移す．
5．リン酸定量の検量線作製に用いるリン酸標準液として，リン酸二水素ナトリウムを0.4, 0.25, 0.2, 0.15, 0.1, 0.05, 0.025 mMの濃度になるように6％(v/v)過塩素酸に溶解する．

6．0.5 N $H_2SO_4$ に 0.3%モリブデン酸アンモニウムを加えた溶液（C溶液）を作製する．
7．リン酸標準液，SBPase 反応液をそれぞれ 40 μl ずつ試験管に入れ，C 溶液を 850 μl 加え，混ぜた後 10 分間室温で静置する．
8．0.035%マラカイトグリーン，0.35%ポリビニルアルコール（D溶液）を 150 μl 加え混ぜた後，45 分間室温で静置し，分光光度計を用いて 620 nm での吸光度を測定する．

## 3.a.8 ホスホリブロキナーゼ（PRK）活性測定法

PRK（EC 2.7.1.19）は Ru5P と ATP から Rubico の基質となる RuBP と ADP を生成する．Fd/Trx 系を介した酸化還元により活性調節を受ける．活性測定は，PRK 反応生成物である ADP の増加量を，LDH，PK とのカップリング反応による NADH の減少量として，チャートスピード 15 mm/min，レンジ 0.4（20 mV），27℃における 340 nm の吸光度変化により測定する．また，基質である Ru5P が非常に高価である（手に入りにくい）ため，R5P をリボース-5-リン酸イソメラーゼ（R5P イソメラーゼ）によって Ru5P に変換する反応をカップルさせて測定する[12]．NADH の 340 nm における分子吸光係数 ε は 6220 $M^{-1}cm^{-1}$ とする．

[実験方法]

1．植物組織（1~2 g wt）に 5 ml の 100 mM Tris-HCl（pH 8.0），10 mM $MgCl_2$，1 mM EDTA，1 mM GSH，2.5 mM DTT（細胞内活性化率を測定する場合は GSH，DTT を除く），1％ Triton X-100 を加え，海砂，PVP をスパチュラに 1 杯ずつ加えた後に乳鉢，乳棒で破砕する．
2．破砕液を遠沈管に移して 12,000× $g$，4 ℃で 10 分間遠心分離後，上清を新しい試験管に移す．（細胞内活性化率を測定する場合は，$N_2$ 置換すること）
3．1 ml セル 2 つに反応系［100 mM Tris-HCl（pH 8.0），10 mM $MgCl_2$，5 mM GSH，1 mM ATP，0.2 mM NADH，50 mM KCl，0.5 mM PEP，5 unit LDH，2 unit PK，2 unit R5P イソメラーゼ］をそれぞれ 1 ml ずつ加え，両方に粗酵素液（10~50 μl）を加えて撹拌する．
4．W ビームのセルホルダーにそれぞれセットし，27℃，吸光度 340 nm の条件で約 2 分間ベースラインを引く．
5．片方のセルにのみ 2 mM R5P を加えて素早く撹拌し，反応開始とする．340 nm の吸光度変化を経時的に測定する（約 10 分間）．
6．上記実験条件で得られたデータから NADH 減少速度を計算し，PRK 活性とする．
7．活性化状態の活性を測定する場合は，粗酵素液に 20 mM DTT を加えて氷上で 30 分間インキュベートした後に，上記 3~6 の方法で PRK 活性の測定を行う．

## 3.a.9 その他の酵素

PGA キナーゼ，TP イソメラーゼ，リブロース-5-リン酸エピメラーゼ[9]，R5P イソメラーゼ[9] があるが，これらのほとんどが上記酵素活性測定法を改変することにより測定可能である．詳細はそれぞれの報告を参照されたい．

## 参考文献


1）E-M Aro, B. Anderson Eds., Regulation of Photosynthesis, p.297-373, Kluwer Academic Press (2001)
2）R. C. Leegood, T. D. Sharkey, S. von Cammerer eds., Photosynthesis: Physiology and Metabolism, pp.9-51, Kluwer Academic Press (2000)
3）R. C. Leegood, T. D. Sharkey, S. von Cammerer eds., Photosynthesis: Physiology and Metabolism, pp.85-113, Kluwer Academic Press (2000)
4）R. M. Lilley and D. A. Walker, Biochim. Biophys. Acta **358** (1974) p.119
5）E. Lazko and R. V. Gibbs, Plant Physiol. **44** (1969) p. 295
6）V. Haake, R. Zrenner, U. Sonnewalt, M. Sttit, Plant J. **14** (1998) p.147
7）K. Nakahara, H. Yamamoto, C. Miyake, Yokota, A., Plant Cell Physiol. **44** (2003) p.326
8）G. Zimmermann, G. J. Kelly, E. Lazko, Eur. J. Biochem. **70** (1976) p.361
9）D. J. Murphy and D. A. Walker, Planta **155** (1982) p.316
10）I. E. Woodrow and D. A. Walker, Arch. Biochem. Biophys. **216** (1982) p.416
11）E. P. Harrison, N. M. Willingham, J. C. Lloyd, C. A. Raines, Planta **149** (1998) p.78
12）E. Racker, Arch. Biochem. Biophys. **69** (1957) p.300

# 3．酵素・電子伝達成分の精製・活性測定・定量
## b．フェレドキシンとフェレドキシン：NADP$^+$ 還元酵素の調製と生化学的解析

榊原由紀子[1)]，長谷　俊治[1)]

フェレドキシンは鉄硫黄クラスターを含む電子キャリアータンパク質で，光合成電子伝達反応では光化学系Ⅰから受け取った電子をフェレドキシン：NADP$^+$ 酸化還元酵素に供与し，NADP$^+$ をNADPH へ還元する反応を駆動している．本章では，植物組織の抽出物からや組換え体としてのこれらの酵素タンパク質を調製する方法とそれらを用いて活性を測定する方法を紹介する．

## Purification and biochemical analysis of ferredoxin and ferredoxin: NADP$^+$ reductase

Yukiko Sakakibara, Toshiharu Hase

Ferredoxin is an electron carrier protein with FeS cluster and transfers electron from photosystem I to ferredoxin: NADP$^+$ reductase, which catalyzes reduction of NADP$^+$ to NADPH in the photosynthetic electron transfer system.　In this chapter, we describe purification methods of these two proteins from plant tissues and recombinant *E. coli* cells, and a typical assay method for the activity of ferredoxin: NADP$^+$ reductase by using Fd as an electron carrier.

### 3.b.1　フェレドキシン（Fd）とフェレドキシン：NADP$^+$ 還元酵素（FNR）の種類

光合成において水の光分解により取り出された電子の励起により生じる強い還元力は，電子伝達系を介して化学還元力に変換される．この還元力は最終的には炭素，窒素，硫黄等の無機物の還元同化や，糖，アミノ酸，脂肪酸，核酸等の生体物質の合成に必要な素材を供給する代謝系の駆動力として用いられる．この植物の独立栄養機能を支える様々な光合成の生体反応は，電子キャリアー蛋白質であるFd を電子供与体とするレドックスカスケードとして，葉緑体内でエネルギー・代謝のネットワークを形成している[1)]．Fd が関与するレドックスカスケードの中で最も主要な経路はFNR への電子供与過程であり，FNR はNADP$^+$ を還元しNADPH に変換する．この光合成電子伝達系によるNADPH の生成過程をNADP$^+$ の光還元反応と呼ばれる．

Fd は分子サイズが12 kDa の酸性タンパク質で，酸化還元中心として［2Fe-2S］クラスターを持つ．生理的条件下では，2原子の鉄イオンのうち一方のみが2価と3価の間を変換するので1電子キャリアーとしてはたらく．その酸化還元電位は-400 mV 前後と低く，還元型Fd は強い還元剤となる．FNR は分子サイズが35 kDa 程度の弱い酸性から中性付近の等電点をもつタンパク質であり，FAD を含むフラビン酵素である．このFAD の酸化還元電位は-350 mV とFd のそれと同程度か若干高く，エネルギー論的にはFd からの電子を受け取るのに適した電位関係にある．Fd から1電子ずつの2回の電子授受によりFAD が2電子還元され，還元型FNR はNADP$^+$ をNADPH に変換する．FNR の立体構造や酵素反応機構については多くの知見が集積しており，フラビン酵素の典型として扱われている[2)]．Fd とFNR との分子間電子伝達反応の際には電子伝達複合体を形成するが，その複合体の構造が解かれており，両者のタンパク質・タンパク質間相互作用の詳細が明らかになっている[3,4)]．

高等植物ではFd とFNR はそれぞれ数種類の分子種として存在している．これらのイソ酵素タンパク質は大きく光合成型と非光合成型に大別され，光合成型の分子種はこれまで述べたように葉緑体内でのNADP$^+$ の光還元反応が主要な生理的役割である．一方，非光合成型Fd やFNR は根のプラスチドと葉緑体の両方に存在し，生理的な反応はNADPH を還元力としたFNR によるFd の還元であり，NADP$^+$ の光還元とは逆方向であると信じられている[5)]．光合成型，非光合成型のグループの中でも，さらにイソ酵素タンパク質として存在する場合があることが報告されているが[6,7)]，その生理的役割にどの

1）大阪大学蛋白質研究所

**表 1**：高等植物の Fd と FNR のイソ酵素タンパク質

| Fd，FNR の分子種 | 発現部位，特徴 | 酸化還元電位（mV） |
|---|---|---|
| トウモロコシ | | |
| FdI | 葉（葉肉細胞），光誘導 | −421 |
| FdII | 葉（維管束鞘細胞），光誘導 | −412 |
| FdIII | 根と葉，非光誘導 | −321 |
| L-FNR1 | 葉，チラコイド膜に局在 | −340 |
| L-FNR2 | 葉，チラコイド膜とストロマに分布 | |
| L-FNR3 | 葉，ストロマに局在 | |
| R-FNR | 根と葉，可溶性 | −350 |
| イロイヌナズナ | | |
| Fd1 | 葉 | −425 |
| Fd2 | 葉 | −435 |
| Fd3 | 根と葉 | −337 |
| LFNR1 | 葉，チラコイド膜に多い | |
| LFNR2 | 葉，ストロマに多い | |
| R-FNR1 | 根と葉， | |
| R-FNR2 | 根と葉，根での主要成分 | |

ような分業があるのか，まだ明確にはなっていない．これらの Fd と FNR の分子種のリストと特徴を表 1 に示した．一般に非光合成型 Fd の酸化還元電子は-350 mV 前後であり光合成型 Fd より 50 mV から 80 mV 程度高く，NADPH/FNR により還元される反応には光合成型 Fd より熱力学的には有利になっている．

## 3.b.2　植物からの調製

### 3.b.2.1　Fd

Fd は比較的安定な可溶性タンパク質である．植物の緑葉を適当な緩衝液中で破砕力の強いブレンダーでホモゲナイズすれば容易に抽出・可溶化され，pH を中性付近に保つことに留意すればほとんど変性は起こらない．残渣や沈殿物を遠心で除いた後，上清に陰イオン交換樹脂を加えると Fd は強く結合する．一方，多くの共雑タンパク質は結合しないので，このバッチ法による大まかな処理はその後の精製ステップに好都合である．著者らの精製方法を以下に示す．これは 2 日―3 日で完了する．

**[実験方法]**

1．ホウレンソウ緑葉 2 kg を氷冷した 2 L の破砕緩衝液（50 mM Tris-HCl，pH 7.5，150 mM NaCl）を用いてワーリングブレンダー（一般のミキサーでも良いが，一度に処理できないので，数度に分ける）で完全に破砕する．ガーゼやミラクロス等でろ過し，大きな残渣は除く．

2．容量が 500 mL から 1 L の遠心管に移し，5000 x g で 10 分間冷却遠心し，上清を得る．以下の操作は氷上か低温室で行うが，すばやいカラム操作等であれば室温でも可能である．

3．破砕緩衝液で平衡化した DEAE セルロース樹脂（DE-52 など）200 g（湿重量）をバッチ法で上清に加えて撹拌し，適当なサイズのブフナーロートに 2 重層にしたミラクロスを敷いて樹脂をろ過により集める．

4．Fd が吸着した樹脂を取り出して破砕緩衝液に懸濁し，適当な大きさのカラムに詰める．同じ緩衝液で樹脂を洗浄した後，Fd を溶出液（50 mM Tris-HCl，pH 7.5，500 mM NaCl）で溶出する．Fd は褐色のバンドとして植物由来の色素類と共に溶出されるので，着色した画分を集める．

5．70%飽和硫安で塩析を行い，10000 x g，15 分間の遠心で上清を得る．相当量の沈殿が出る．上清に回収された Fd は 50 mM Tris-HCl，pH 7.5，70%飽和硫安で平衡化した DE-52（50 g 湿重量の樹脂をカラムに詰めたもの）に重層する．この条件で Fd は樹脂に結合する．

6．結合した Fd は 50 mM Tris-HCl，pH 7.5，500 mM NaCl で溶出し，赤褐色画分を得る．この画分を 50 mM Tris-HCl，pH 7.5，150 mM NaCl に透析（外液は 50 倍以上）する．ここまでが 1 日目の工程．

7．DEAE を結合官能基としてもつイオン交換樹脂で中圧に耐えうるもの（DEAE トーヨーパールや Resource Q）を用いてカラムクロマトグラフィー（200 ml 程度のカラム容量）を行う．50 mM Tris-HCl，pH 7.5 緩衝液中で NaCl の 150 mM から 500 mM の濃度勾配（総体積 500 mL）で溶出する．Fd は明瞭な赤褐色バンドとして回収できる．

8．Fd 画分を疎水カラムクロマトグラフィー（Phenyl トーヨーパールや Phenyl Sepharose，50 mL カラム体積）で精製を進める．Fd 画分に同体積の 100%飽和硫安液を加えて 50%とし，50 mM Tris-HCl，pH 7.5，50%飽和硫安で平衡化したカラムに掛け，硫安濃度 50%から 0 %への逆濃度勾配 200 ml で溶出する．Fd は純度が十分高い状態で得られ，大抵の生化学的実験はこの精製段階のものを用いることができる．ここまでが 2 日目の工程．通常 20-30 mg の精製標品が得られる．

9．もし，精製度が不十分であれば（後述の純度検定により），共雑物の大部分は核酸である．ゲルろ過カラムクロマトグラフィーを行う．Superdex 75 あるいは同等品を用いて，50 mM Tris-HCl，pH 7.5，150 mM NaCl を展開緩衝液としてクロマトグラフィーを行う．

トウモロコシのような硬い葉の場合は，組織重量に対して加える破砕緩衝液の量を増やして，ブレンダーの回転を容易にする．ホリフェノール類が多量に含まれている組織では，吸着剤であるポリビニルピロリドンを組織重量の 10%程度まで加えると除去効果が顕著である．また，必要な場合には，タンパク質分解酵素阻害剤（カクテルとして市販されている）を加えて分解を抑える配慮をする．適宜判断したらよい．

### 3.b.2.2 FNR

ホウレンソウ緑葉出発材料とする場合，FNR の大部分はチラコイド膜に結合した状態を保ちながら植物葉を破砕して，得られる膜断片から精製する方法を述べる．最初に FNR を可溶化する方法もあるが，大量の共雑タンパク質から FNR を分画する操作をいくつも重ねる必要があるのでやや面倒である．チラコイド膜からの調製法は収量は落ちるが，精製操作は簡単であり失敗はほとんど無い．

#### [実験方法]

1．ホウレンソウ 5 kg に対して氷冷した破砕液（50 mM Tris-HCl，300 mM Sorbitol）5 L の割合で加え，ブレンダーを用いて弱く破砕する（緑葉の細かい断片がつぶ状に残っている位が目安）．2 重層のミラクロスでろ過して大きい残渣は取り除き，緑色のホモジェネートを得る．

2．Fd のときのステップ 2 と同様の遠心を行うが，今度は緑色の沈殿画分を回収する．

3．沈殿を 60 mL の 50 mM Tris-HCl，100 mM NaCl に懸濁し，−20°C に冷却したアセトン 240 mL を加えてよく混ぜる．アセトンの終濃度は 80%（v/v）程度とする．タンパク質はほとんど沈殿するが，クロロフィルは可溶性画分に移る．

4．アセトン溶液を 10000 x g，15 分間冷却遠心する．緑色の上清を完全に取り除き遠心管の底に集まった沈殿を得る．

5．50 mM Tris-HCL，50 mM NaCl を 100 mL を加えて沈殿を溶解する．大部分は解けるが，一部は残る．残渣は 4．と同じ遠心操作で取り除く．

6．上清を Fd のときのステップ 7 と同様のイオン交換カラムクロマトグラフィーを行う．ただし，NaCl の濃度勾配は 50 mM から 500 mM とする．フラビンの黄色を呈する FNR 画分が目視で確認できる．もし，色調があいまいであれば後述の活性測定で溶出液をモニターする．NaCl 濃度が 150 mM 前後で溶出されるはずである．

7．FNR 画分を 50 mM Tris-HCl，pH 7.5 に透析する．ここまで 1 日目の工程．

8．Fd セファロース樹脂を用いたアフィニティーカラムクロマトグラフィーを行う（50 mL カラム体積）．Fd セファロース樹脂を 50 mM Tris-HCl，pH 7.5 で平衡化し，透析済みの FNR 画分を掛ける．NaCl の 0 mM から 500 mM の濃度勾配 200 mL で溶出する．FNR の精製標品を得る．ここまで 2 日目の工程．20 mg 程度の標品が得られる．

### 3.b.2.3 Fd-セファロース樹脂の調製

FNR の精製には Fd 固定化樹脂を用いたアフィニティークロマトグラフィーが有効である．Fd を固定化した樹脂は一般には市販されていないが，簡単に自作できる．

#### [実験方法]

1．Fd の精製標品 30 mg 程度を 100 mM $NaHCO_3$，300 mM NaCl（pH は 8 程度になる）に十分透析する．Tris 緩衝液等，アミノ基類を含む物質は完全に除く．

2．BrCN で活性化したセファロース樹脂（市販品）10 g を 200 mL の 1 mM HCl に懸濁し，樹脂に混在している安定剤等を完全に溶解する．

3．シンターガラス付のロートで懸濁した樹脂を弱く吸引ろ過し，樹脂の乾燥を避けながら，1 L 以上の 1 mM HCl でよく洗浄する．

4．透析済みの Fd をキャップの付いた広口ボトル（100 mL 程度）に入れ，透析外液と同じ 100 mM $NaHCO_3$，300 mM NaCl を加えて 50 mL 前後にする．

5．この Fd 溶液に洗浄した樹脂をスパチュラで少量ず

つ懸濁しながら加える．すべての樹脂がFd溶液と混合し，キャップをして低温を保ちながらシェーカーでボトルごと緩く撹拌する．数時間から終夜撹拌でほとんどのFdは樹脂に共有結合する．

6．ボトルを静置すると樹脂が沈む．上澄みの色(Fdの赤褐色）がほとんど無色になれば固定化完了である．膨潤した樹脂の体積1 mLあたり1–2 mgのFdが固定化し，樹脂は赤褐色を呈する．1 M Tris-HCl，pH 7.5を終濃度100 mMになるよう加えて，樹脂の未反応の官能基をブロックする．

7．Fdが固定化した樹脂をカラム（50 mL体積）に詰めて，50 mM Tris-HCl，pH 7.5，1 M NaClでよく洗浄して，遊離のFdは完全に除く．Fd樹脂はこの状態で少なくとも数ヶ月は安定に低温保存できる．

## 3.b.3　大腸菌組換え酵素タンパク質として調製

近年では，植物のFdやFNRの遺伝子を大腸菌を宿主とする組換えDNAの方法で発現させて，生化学や物理化学実験に十分な数十から数百mgを調製している場合も多い．ここでは[2Fe-2S]クラスターやFADをもったホロ型のFdやFNRの組換え体の発現と精製方法について述べる．

### 3.b.3.1　遺伝子のコンストラクト

以下の3点に留意する．

1）cDNAクローニングやRT-PCRで得られた遺伝子は，葉緑体への移行シグナルをもった前駆体をコードする場合が多い．この延長ペプチド部分はあらかじめ取り除く必要がある．成熟体のN末端構造が未知であれば他の構造が判明しているFdやFNRから推定する．

2）発現ベクターには特に制限はないが，古くはpTrcベクター，近年ではpET系ベクターやpQEベクターが使われている．精製に便利なようにタグを付けるとの考え方もあるが，FNRのC末端のTyrは酵素活性に必須あり[8]，またFNRのN末端領域[9]やFdのC末端領域[4]は両者の相互作用に何らかの役割を果たしている可能性があるので，安易にタグをつけることは避けた方が良い．

3）組換え体の発現量が低く，大腸菌発現系の大量調製の利点が生かせない場合がある．これまでの経験から2つの解決方法が工夫されている．翻訳開始Metから直後の下流のコドンの第3番目の塩基がGあるいはCが多い場合は発現量が少なくなる傾向がある．N末端側から10残基くらいまでを目安に3番目にGCが多ければ，アミノ酸変異を伴わないように3番目の塩基がATであるコドンに改変する．これだけで発現量が大幅に増加する場合がある[10]．もう一つは大量に発現している大腸菌タンパク質の遺伝子のコドン頻度を考慮して，組換えタンパク質の遺伝子を完全に化学合成する方法である[6]．Fd遺伝子の場合は300塩基程度であるので化学合成はそれほど手間を必要としない．

### 3.b.3.2　ホロ型の酵素タンパク質の発現条件

大腸菌の細胞中では大量に発現するが，補欠分子族の持たないアポ型となり，封入体に取り込まれる場合もある．人工的にホロ型に再構成することも報告されているが[11]，手間がかかるので，できればホロ型で発現させる方が好都合である．大腸菌の生育温度や遺伝子の転写誘導剤の濃度などの，一般的な発現条件を検討することで改善する場合も多い．20°Cから37°Cの温度範囲で，誘導剤であるIPTGの濃度が0 mM，0.01 mM，0.05 mM，0.1 mM，0.5 mMと変化させて，いくつかの組み合わせを試せばよい．組換えタンパク質の発現速度が遅くなる低温での培養が，タンパク質のフォールディングが効率よく行われる可能性が高いと思われるが，われわれの経験からはFdやFNRのホロ型変換の効率には必ずしもこのような傾向があるわけではない．温度は高温側で誘導剤の濃度が低い方が良い場合や，反対に低温側で高濃度の誘導剤の方が良い場合もある．大量にホロ型が発現すればFdの場合は菌体の色調が赤色に，FNRの場合は緑黄色を呈するので，目視でホロ型としての発現量を簡便に見積もることができる．ホロ型の発現量の条件検討にはそれほど手間はかからない．

### 3.b.3.3　精製方法

基本的には植物組織抽出物を出発材料とする場合と類似している．菌体の色がFdやFNRの補欠分子族の色調として見えるくらい高発現しているのであれば，植物組織での発現量に比べ組換え体の場合の方が，総タンパク質量あたりの含量が相当多いので，精製は容易である．大腸菌体の破砕と抽出物に含まれる大量の核酸類の除去に留意すれば，あとは特に問題点はない．

Fdを発現している大腸菌の場合は，菌体重量の3倍量程度の50 mM Tris-HCl，pH 7.5，150 mM NaCl，1 mM $MgCl_2$，1 mM EDTA，0.5%メルカプトエタノール，1 mM PMSFで菌体を懸濁し，超音波破砕で細胞を処理する．超音波により菌体から出てくる核酸が断片化されるので，破砕液の粘度が十分に低下すれば，良好に破砕できたことの目安となる．10000 x gで15分間の冷却遠心で上清をとり，バッチ法のDE-52処理を行う．Fdは樹脂

に吸着した画分から回収される．これ以降の操作は植物組織の場合と同じであるが，精製初期のステップではFd画分には核酸が相当量混入してくるので，両者を分けることができるクロマトグラフィーの溶出条件等を工夫する．

FNRを発現している大腸菌の場合は，菌体重量の3倍量の50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 200 mM NaCl, 1 mM $MgCl_2$，1 mM EDTA，0.5%(v/v)メルカプトエタノール，1 mM PMSFで菌体を懸濁し，超音波破砕で細胞を処理する．10000 x gで15分間の冷却遠心で上清をとり，バッチ法のDE-52処理を行う．FNRは未吸着の画分に回収される．核酸の大部分は吸着するのでこのバッチ操作で効果的に核酸除去が可能となる．FNR画分は30%－60%飽和硫安による塩析処理をし，60%沈殿物を50 mM Tris-HCl，pH 7.5に透析して，それ以降のイオン交換クロマトグラフィーやFdアフィニティークロマトグラフィーは植物組織由来の場合と同様に行う．もし，FNRの発現量が非常に多い場合は，一回のFdアフィニティークロマトグラフィーではFd樹脂の吸着容量を越えることもあるので，数回に分けて行う．FNRの量が多ければ，Fdアフィニティークロマトグラフィーをさけて，疎水クロマトグラフィーやゲルろ過クロマトグラフィーでも精製は可能である．

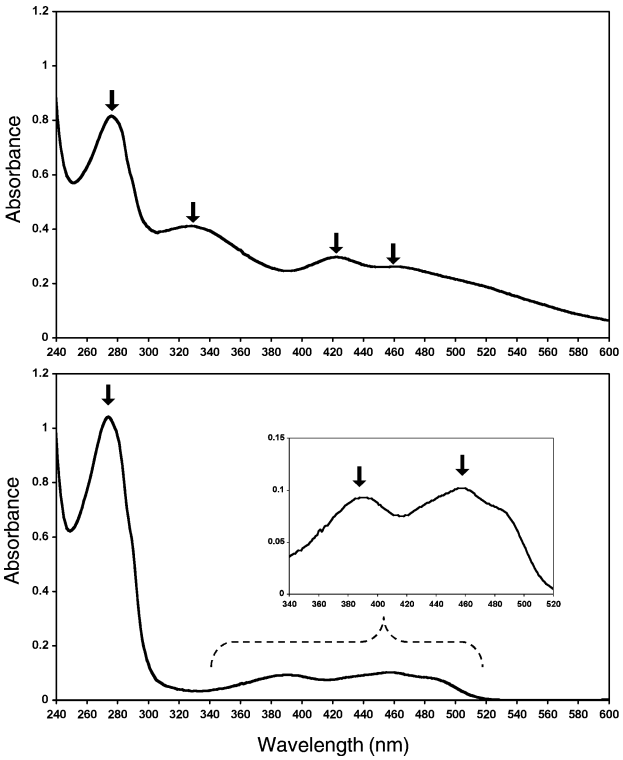



**図1**：FdとFNRの吸収スペクトル
トウモロコシ由来のFdとFNRを大腸菌組換え体として精製した標品の可視紫外の吸収スペクトルを用す．Fd（上図）は461 nm，423 nm，328 nm，276 nmに吸収極大を，FNR(下図）は457 nm，391 nm，274 nmに吸収極大を示している．

## 3.b.4　吸収スペクトルと純度評価

可視部に吸収極大のある補欠分子属を含む酵素タンパク質の純度は，補欠分子属由来の極大波長とタンパク質の吸収極大波長である280 nm付近における吸光度の比を指標として評価する場合が多い．FdとFNRもこのような純度評価が一般的で適用されている．

両方の酵素タンパク質とも精製した状態では酸化型であり，図1にこれらの典型的な吸収スペクトルを示した．Fdは460 nm，420 nm，330 nm付近に[2Fe-2S]クラスター由来の吸収極大が認められ，420 nm付近の吸収極大のミリモル分子吸光係数は9.6 $mM^{-1}cm^{-1}$であり，この値を用いて定量できる．精製標品の420 nmと275 nm付近の極大波長での吸光度比は0.45-0.55の範囲にくる．この値にかなりの幅があるのは，ポリペプチド鎖に含まれる芳香族アミノ酸（主にトリプトファンとチロシン）の残基数によりタンパク質由来の吸収の大きさが変動するからである．個々のFdの分子種で精製標品の値を知っておくと便利である．FNRはFAD由来の吸収極大が455 nm，385 nm付近にある．455 nmのミリモル分子吸光係数は10.7 $mM^{-1}cm^{-1}$である．精製標品の455 nmと275 nm付近の極大波長での吸光度の比は0.11から0.12の範囲にある．

純度を評価するために一般的なSDSゲル電気泳動を用いることももちろん可能であるが，Fdの移動度は標準的なタンパク質のそれからは相当外れ，実際の分子サイズが11-12 kDaであっても，ゲル上では17-20 kDa位の場所に移動する．また，精製標品であっても複数のバンドに分かれる場合もある．これは，Fdの異常な振る舞いは，強酸性のタンパク質であるFdに結合するSDSの量が標準的なタンパク質より大幅に少ないためであると考えられる．FNRの場合はこの様なことはなく，分子サイズに応じた移動度を示す．

## 3.b.5　活性測定[5)]

FNRとFdの活性は，NADPHを電子供与源，Cyt $c$を電子受容体として，Cyt $c$の還元を分光学的にモニターする方法が一般的である．FNRのNADPHとFdに対するKm値は数$\mu$Mから数十$\mu$M程度，FNRの分子活性は1秒間あたり数十から数百程度であるので，測定の条件決定の際にこれらの数値を考慮すればよい．こ

こではFdに対するKm値を求めるための活性測定を実例として説明する．

[実験方法]

1．FdとFNRを除いた反応液の組成（終濃度）は以下のようにする．
50 mM Tris-HCl，pH 7.5
100 mM NaCl
100 $\mu$M NADPH
5 mM Glucose-6-リン酸（G6P）
1 unit G6P デヒドロゲナーゼ（市販品）
200 $\mu$M Cyt *c*

2．これに0–50 $\mu$Mにまたがる所定の濃度のFdと数十nMのFNRが加わり活性測定のための全成分がそろう．FNRは生物種により分子活性が異なるので，活性測定に適した濃度を予備実験で求めておく．最大の活性を測定する場合に1分間でCyt *c*の還元が完了する位を目安とする．

3．Cyt *c*の還元は550 nmの吸光度の増加で追跡する．還元型Cyt *c*の分子吸光係数は29 $mM^{-1}cm^{-1}$であるので，1 cmの光路長のセルでは濃度が濃すぎて測光が困難である．光路長が2 mmのセルを用いると全還元されて吸光度が1.2程度になる．

4．実際の測定にあたっては，反応の開始はNADPHの添加により反応をスタートさせ，550 nmの吸光度変化を連続的に記録する．反応液にはNADPHの再生系が含まれているので，時間に比例して反応が直線的に進行する．

5．Fdの各濃度で同様の測定を行い，直線の勾配から還元速度を算出する．Cyt *c*の酸化型と還元型との差スペクトルにおいて，550 nmの分子吸光係数は19.5 $mM^{-1}cm^{-1}$である．

6．Cyt *c*はウシやウマの心筋由来の市販品を用いる．この標品には相当量の共雑物が含まれているらしく，50 mM Tris-HCl，pH 7.5に溶解するとCyt *c*は還元型となる割合が多い．フェリシアンカリウムを少量加えて完全酸化型に戻し，カルボキシ（CM）セルロースなどの陽イオン交換樹脂に吸着し，50 mM Tris-HCl，pH 7.5で十分洗浄したのち，50 mM Tris-HCl，pH 7.5，500 mM NaClで溶出する．吸着・溶出したCyt *c*は50 mM Tris-HCl，pH 7.5に透析する．この操作でほとんどのCyt *c*が酸化型となった標品が得られる．−20°Cで凍結保存できる．

7．光路長が1 cmの標準セルを用いる場合はCyt *c*の濃度を40 $\mu$Mに下げる．ただし，この濃度と同程度の高濃度のFdによる測定は難しくなる．また，マイクロタイタープレートを用いても工夫をすれば簡便に測定出来る．

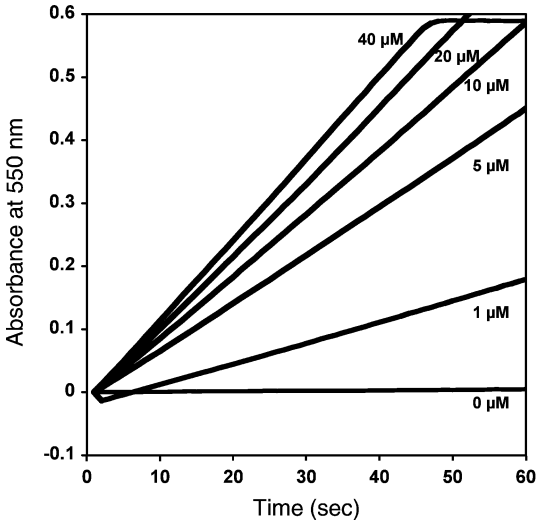



**図2**：NADPH/FNR/FdによるCyt *c*の還元測定の一例
実験方法に記したアッセイ条件で，Fd濃度を0 $\mu$M，1 $\mu$M，5 $\mu$M，10 $\mu$M，20 $\mu$M，40 $\mu$Mと変化させて，Cyt *c*の還元を550 nmの吸光度の時間変化でモニターしている．測定に当たっては，反応スタート時の吸光度をゼロになるよう記録している．

## 参考文献


1）T. Hase, P. Schurman, & D. B. Knaff, Photosystem I, ed. J. H. Golbeck, Dortrecht, Springer, 2006, p.477

2）P. A. Karplus, M. J. Daniels & J. R. Herriott, Science, **250** (1991) p.60

3）R. Morales, M-H. Charon, G. Kachalova, L. Serre, M. Medina, C. Gomez-Moreno & M. Frey, EMBO Reports, **1** (2000) p.271

4）G. Kurisu, M. Kusunoki, E. Katoh, T. Yamazaki, K. Teshima, Y. Onda, Y. Kimata-Ariga & T. Hase, Nat. Struct. Biol. **8** (2001) p.117

5）Y. Onda, T. Matsumura, Y. Kimata-Ariga, H. Sakakibara, T. Sugiyama and T. Hase, Plant Physiol. **123** (2000) p.1037

6）G. T. Hanke, Y. Kimata-Ariga, I. Taniguchi & T. Hase, Plant Physiol. **134** (2004) p.255

7）G. T. Hanke, S. Okutani, Y. Satomi, T. Takao, A. Suzuki & T. Hase, Plant Cell Environ. **28** (2005) p.1146

8）Z. Deng, A. Aliverti, G. Zanetti, A. K. Arakaki, J. Ottado, E. G. Orellano, N. B. Calcaterra, E. A. Ceccarelli, N. Carrillo & P. A. Karplus, Nat. Struc. Biol. **6** (1999), p.847

9）M. Maeda, Y. H. Lee, T. Ikegami, K. Tamura, M. Hoshino, M. Yamazaki, M. Nakayama, T. Hase & Y. Goto,

Biochemistry, **44** (2005) p.10644
10) T. Matsumura, Y. Kimata-Ariga, H. Sakakibara, T. Sugiyama, H. Murata, T. Takao, Y. Shimonishi & T. Hase, Plant Physiol, **199** (1999) p.491
11) K. Teshima, S. Fujita, S. Hirose, D. Nishiyama, G. Kurisu, M. Kusunoki, Y. Kimata-Ariga & T. Hase, FEBS Lett. **546** (2003) p.189

# 3．酵素・電子伝達成分の精製・活性測定・定量
## c．シトクロム

永島　賢治[1)]

紅色光合成細菌の反応中心への電子供与体として働く水溶性シトクロム *c* を中心に，その基本的性質や精製法および定量法などを解説する．

## Soluble cytochromes *c* and HiPIP in purple photosynthetic bacteria

Kenji V. P. Nagashima

Biochemical natures and methods for isolation and quantification of soluble electron donor proteins working for reduction of photo-oxidized reaction centers in purple photosynthetic bacteria are described.

### 3.c.1　紅色細菌における水溶性電子供与体の種類と性質

ヘムを結合したタンパク質のうち，そのヘムの中心にある鉄原子がイオン価を変える（$Fe^{2+} \leftrightarrows Fe^{3+}$）ことで可逆的に電子の授受を行うものを一般的にシトクロムと呼ぶ[1)]．結合するヘム構造の違いにより *a*，*b*，*c*，*d* 型に大別され，生理機能の違いやアミノ酸配列の違いによってさらに細分化される大きなタンパク質ファミリーを形成している．このうち，本項では反応中心への電子供与体として働く水溶性の *c* 型シトクロムを対象に記述することとする．

葉緑体・シアノバクテリアの光化学系Ⅰや非酸素発生型光合成細菌では低分子量の電子伝達タンパク質が反応中心への電子供与体として働く．このような電子供与体として古くからよく知られ研究に用いられてきたものに紅色光合成細菌のシトクロム $c_2$ がある[2)]．シトクロム $c_2$ は紅色細菌の $\alpha$ グループの種に共通して見られる電子伝達タンパク質で，呼吸鎖においてもシトクロム酸化酵素への電子供与体として働く．SDS-PAGE で見た分子量は1万ダルトン前後でヘムを一つ結合しており，酸化還元中点電位は 300 mV をやや上回る．還元型の吸収スペクトルでは $\alpha$ 吸収帯のピークが 549–551 nm に現れる．$\beta$ グループおよび $\gamma$ グループの紅色光合成細菌ではシトクロム $c_2$ は見られず，替わりにシトクロム $c_8$ が合成される．シトクロム $c_8$ は分子量が8千前後でシトクロム $c_2$ に比べやや小さいが，酸化還元中点電位と吸収スペクトルはシトクロム $c_2$ とよく似ている．ただしシトクロム $c_8$ が反応中心への主要な電子供与体となっていることを示す報告は無く，これらの細菌では高電位鉄イオウタンパク質（HiPIP）が生理的な電子供与体となっているようである[2)]．他に分子量 20–30 キロダルトン（kDa）でヘムを二つ含むシトクロム $c_4$ も反応中心への電子供与体として働くことが示唆されている[3)]．また，$\alpha$ グループの一部の細菌（*Rhodobacter* 属および *Rhodovulum* 属の一部）ではシトクロム $c_y$ またはシトクロム $c_{2m}$ と呼ばれる膜結合型のシトクロムが合成され，シトクロム $c_2$ と同様の働きをしていることが知られている[4–6)]．これら膜結合型シトクロムはシトクロム $c_2$ と高いアミノ酸配列相同性を示すが，N末端側に膜を一回横切る疎水性領域が付加している点が特徴で，分子量は 20 から 50 kDa と幅がある．

### 3.c.2　精製法

シトクロム $c_2$ および類似の機能を持つ各種電子伝達タンパク質はいずれもペリプラズム空間に含まれる水溶性の低分子量タンパク質である．可視光領域に特有の吸収帯を持ち実験操作中も容易に視認できるため単離・精製は比較的簡単である．一般的な精製の流れを図1に示す．精製に用いる菌体は光合成条件下で指数増殖後期または定常期まで培養したものを用いる．電子伝達タンパク質は定常期に達しても直ちに分解されることはないが，定常期を過ぎて数日放置した菌体を用いると収率が落ちるようである．集菌から細胞破砕・分画までの流れは光合成膜標品（クロマトフォア）を調製する操作と共通である．細胞破砕の方法として図ではフレンチ・プレ

1）首都大学東京　大学院　理工学研究科　生命科学専攻　細胞エネルギー研究室

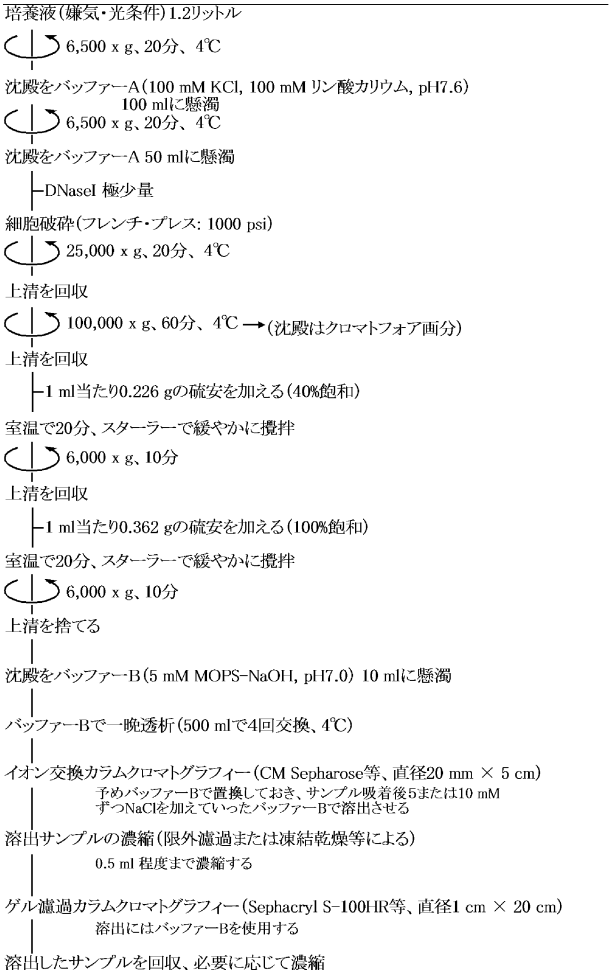



**図1**：紅色光合成細菌からの水溶性電子伝達タンパク質の単離手順

スを用いているが超音波破砕などでもかまわない．いずれにせよ超遠心分離により膜標品を沈殿させた上清を粗抽出液として精製を進める．また，細胞をリゾチームで処理してスフェロプラスト化し，その結果得られるペリプラズム画分を粗抽出液としても良い．この場合リゾチームが良く効いているかどうか時々確認することが望ましい．確認は処理溶液1量に対し蒸留水を10倍量程度加え光学顕微鏡で観察して行う．この時，細胞がスフェロプラスト化していれば細胞が丸く膨潤している様子が観察できるはずである．

粗抽出液はまず硫安沈殿法により大まかに画分する．電子伝達タンパク質の大部分は40%-100%硫安分画として得られる．100%硫安による沈殿物を緩衝液に懸濁し，透析により硫安を除去する．透析後のサンプルはイオン交換カラムクロマトグラフィーにかける．シトクロム $c_2$ および類似の水溶性電子伝達タンパク質の等電点は塩基性側にあることが多く，中性域のバッファーを使った場合DEAE等の陰イオン交換カラムには吸着しないことがある．下にいくつかの紅色細菌でのイオン交換カラムクロマトグラフィーの選択について例示するが，まずはサンプルの一部をカラムに乗せてみて吸着するかどうか確認してから全量をアプライすると良い．

・*Rubrivivax gelatinosus*

反応中心への電子供与体として複数の水溶性電子伝達タンパク質の存在が知られている．これらのタンパク質はいずれも陽イオン交換樹脂(CM Sepharose)に吸着する．吸着したタンパク質のうちまずHiPIPが30 mMの塩強度で緑がかった茶色いバンドとして回収される．55 mMの塩強度で赤いシトクロム $c$ のバンドが動き出すが，移動の速いバンドと遅いバンドの二つに分かれる．移動の速いほうがシトクロム $c_8$ で，遅いほうがシトクロム $c'$である．

・*Rhodobacter sphaeroides*

DEAE Sepharoseなどの陰イオン交換樹脂を用いて精製する．この場合カラムに乗せる前に予め少量のアスコルビン酸で還元型にしておくと樹脂への吸着が安定し，70-80 mMの塩強度でシトクロム $c_2$ が溶出する．光合成培養した場合，他のシトクロムは極めて微量である．

・*Blastochloris virids*

CM Sepharoseなどの陽イオン交換樹脂を用い，10-20 mMの塩強度でシトクロム $c_2$ を溶出させる．カラムに乗せる前に予め少量のフェリシアナイドで酸化型にしておくと樹脂への吸着が安定する．他のシトクロムはほとんど見られない．

これらのタンパク質には目で見える色が付いているので，カラムへの吸着や移動を確認することは容易である．また，カラム操作の過程で緩衝液中に終濃度1 mM程度のアスコルビン酸またはフェリシアナイドを加えておくと酸化還元状態が安定しバンドがシャープになるようである．溶出させたサンプルは，必要に応じて限外濾過やポリエチレングリコール等で濃縮し，ゲル濾過カラム(Sepharose S-100など)にかけ分子量の異なるタンパク質を除去する．この操作は脱塩も兼ねる．以上の操作で得られる電子伝達タンパク質の収量は，*B. viridis* のシトクロム $c_2$ の場合で1 lの培養から40 $\mu$mol位である．これらのタンパク質は比較的安定であり，常温での測定で半日程度，氷上での保存で1週間程度（ただし暗中）なら吸収スペクトルに変化は見られない．長期に渡って保存する場合は−80℃で冷凍保存，あるいは凍結乾燥することが望ましい．

なお，電子伝達タンパク質には水溶性のものだけでな

く膜に緩く結合しているものや吸着しているものも少なくない．こうしたタンパク質を精製するためには膜標品との分離の際に高イオン強度の緩衝液または低濃度の界面活性剤を含む緩衝液を使用する．タンパク質が静電的相互作用で膜に吸着している場合は前者が，疎水性相互作用の場合は後者の緩衝液が必要である．例として *Rvi. gelatinosus* の場合では 0.1%オクチルグルコシドを添加することで 2 ヘム型のシトクロムであるシトクロム $c_4$ が得られる．このシトクロムは陽イオン交換カラムでは 40 mM の塩強度で溶出する．

## 3.c.3　精製したシトクロムの定量と検定

紅色細菌に見られる各種電子伝達タンパク質の酸化型および還元型での吸収スペクトルを図 2 に示す．濃度を求める際は HiPIP の場合 430 nm での吸光係数を 4 $mM^{-1}$ とし，シトクロム $c$ では酸化還元差スペクトルでの $\alpha$ 帯（550 nm 付近）の吸収変化に対し 19 $mM^{-1}$ とするのが一般的である．シトクロム c' では $\gamma$ 帯(430 nm 付近)での酸化還元差に対し 30 $mM^{-1}$ の吸光係数を適用する．ただしこれらの吸光係数はあくまでも目安であり，種によって吸収帯の形は微妙に異なるのが普通である．シトクロムの場合，より正確なヘム濃度を求める方法としてはピリジン-ヘモクロム法がよく利用される．1 ml のサンプル溶液に 200 mM NaOH と 40%のピリジンを含む混液 1 ml を加え攪拌した後，酸化(フェリシアナイド添加）還元（ジチオナイト添加）差スペクトルを測定する．$c$ 型ヘムの場合，$\alpha$ 帯の吸収ピークは 550 nm に現れ，吸光係数は 24 $mM^{-1}$ とされている[7]．

シトクロムは電気泳動後のゲル上で特別な処理をせずとも特異的に染色できる．特に $c$ 型シトクロムの場合はヘムがジスルフィド結合を介してペプチドと強固に繋がっているため SDS-PAGE 後でも特異的な検出が可能である．3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine(TMBZ)をメタノールに 6.3 mM となるように溶かした溶液をＡ液，0.25 M 酢酸ナトリウムを氷酢酸で pH 5.0 に調整した溶液をＢ液とし，これらをＡ：Ｂ＝3：7 に混合する．泳動後のゲルをこの混合液に浸し，緩やかに振とうしながら 1 時間以上暗中に置いた後 30 mM となるように過酸化水素を加えるとシトクロム $c$ のみが青緑色のバンドとして検出できる[8]．洗いにはイソプロパノールとＢ液を 3：7 の量比で混合した溶液を使用する．この処理の後で CBB による通常のタンパク質染色も可能であるので，精製したシトクロム $c$ の精製度の評価も容易であろう．

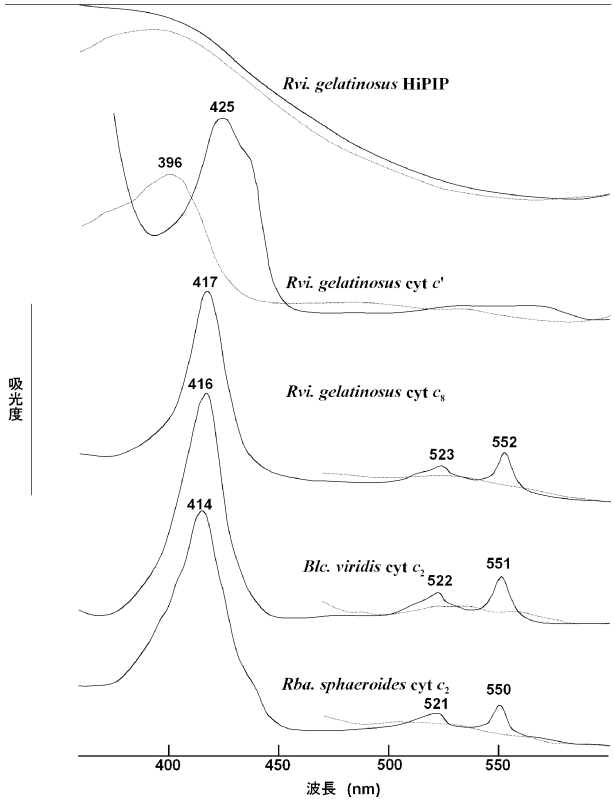



**図 2**：各種電子伝達タンパク質の吸収スペクトル
実線は還元型，点線は酸化型でのスペクトルを表す．

## 参考文献


1）G. Palmer, & J. Reedijk, Eur. J. Biochem. **200** (1991) p. 599.
2）T. E. Meyer, & T. J. Donohue, Anoxygenic Photosynthetic bacteria, eds. R. E. Blankenship, M. T. Madigan, & C. E. Bauer, Dordrecht, Kluwer, 1995, p.725.
3）永島賢治，光合成研究 **17**（2007）p.29.
4）F. E. Jenney, & F. Daldal, EMBO J. **12** (1993) p.1283.
5）H. Myllykallio, D. Zannoni, & F. Daldal, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **96** (1999) p.4348.
6）Y. Kimura, J. Alric, A. Verméglio, S. Masuda, Y. Hagiwara, K. Matsuura, K. Shimada & K. V. P. Nagashima, J. Biol. Chem. **282** (2007) p.6463.
7）E. A. Berry, & B. L. Trumpower, Anal. Biochem. **161** (1987) p.1.
8）P. E. Thomas, D. Ryan, & W. Levin, Anal. Biochem. **75** (1976) p.168.

# 3．酵素・電子伝達成分の精製・活性測定・定量
## d．プラストシアニン

日比野　隆[1)]，田中　義人[1)]，高倍　昭洋[2)]

プラストシアニンは光合成電子伝達反応において，シトクロム $f$ から電子を受容し，光化学系Ⅰへと電子を供与する銅タンパク質である．本章では，植物およびラン藻のプラストシアニンの抽出・精製法，定量および活性測定法について紹介する．

## Purification and Analysis of Plastocyanin in Photosynthetic Organisms

Takashi Hibino, Yoshito Tanaka, Teruhiro Takabe

Plastcyanin is a blue-copper protein, which accepts electron from cytochrome f and donates to photosystem I reaction center. In this chapter, we introduce protocols for purification of plastocyanin from photosynthetic organisms and methods for kinetic analysis of redox reaction. Structural and functional properties of plastocyanin have been described.

### 3.d.1　PC の分子的性質

プラストシアニン（以下 PC と略す）は，分子量約 10 kDa の銅タンパク質である．植物では葉緑体に存在しており，酸化型 PC は鮮やかな青色を呈する．葉緑体中の存在量はクロロフィルの 1/200～1/300 で，光合成単位あたり 1 分子の割合に相当する[1)]．PC は，種子植物からラン藻にいたるまで多くの光合成生物種で存在が報告されている．植物の PC は等電点（p$I$）が酸性だが，一部のラン藻の PC には p$I$ が中性や塩基性のものがあり，イオン交換カラムを用いて精製を行う場合には注意が必要である．いくつかの生物種について報告されている p$I$ の値を表 1 に示す．

PC のX線結晶構造解析によって，PC の表面には 2 つの重要な部位が存在することが明らかにされている（図 1）．一つの部位は電子移動反応に関与する疎水的な部分（サイト 1）であり，もう一つは反応相手であるシトクロム $f$ や光化学系Ⅰと静電気的に相互作用して複合体を形成する部分（サイト 2）である[6)]．サイト 1 は，疎水性アミノ酸の中にヒスチジンが存在する．サイト 2 は，多くの PC で保存されているチロシンの周りをいくつかの電荷をもつアミノ酸が取り囲む構造をとっている．サイト 2 は生物種によって多様であり，植物ではアスパラギン酸やグルタミン酸残基からなる二ヶ所のパッチから構成されているが，ラン藻では負電荷の数が少なく，一方のパッチではむしろ正電荷が多く分布する．このため，植物では pI が酸性なのに対して一部のラン藻では中性や塩基性になる[7)]．

### 3.d.2　PC の電子伝達反応[8)]

植物の PC は疎水結合と静電気的結合の両方でシトクロム $f$ と一時的に複合体を形成し，電子伝達反応が起こる．溶液の反応系では，反応の $t_{(1/2)}$ は 200 マイクロ秒程度である[9)]．PC による光化学系Ⅰ反応中心の還元反応は，衝突によるもの（タイプⅠ），複合体の形成を経るもの（タイプⅡ），複合体形成の際に相互作用表面の構造変化を伴うもの（タイプⅢ）に分けられる[10)]．タイプⅠおよびタイプⅡはラン藻の PC にみられ，タイプⅢは主に植物にみられる．タイプⅢの反応は二相性を示し，最初の速い反応は数マイクロ秒で進行するが，遅い反応は，その 100 倍程度の時間で進行する．

**表 1**：様々な生物種の PC の等電点および酸化還元電位[7)]

| | 等電点 | 酸化還元電位（mV） |
|---|---|---|
| 種子植物 | | |
| ホウレンソウ | 4.2 | 370 |
| 緑藻 | | |
| *Monoraphidium braunii* | 3.7 | 350 |
| ラン藻 | | |
| *Synechocystis* sp. PCC6803 | 5.5 | 358 |
| *Anabaena* sp. PCC7119 | 8.8 | 355 |

1）名城大学大学院総合学術研究科
2）名城大学総合研究所

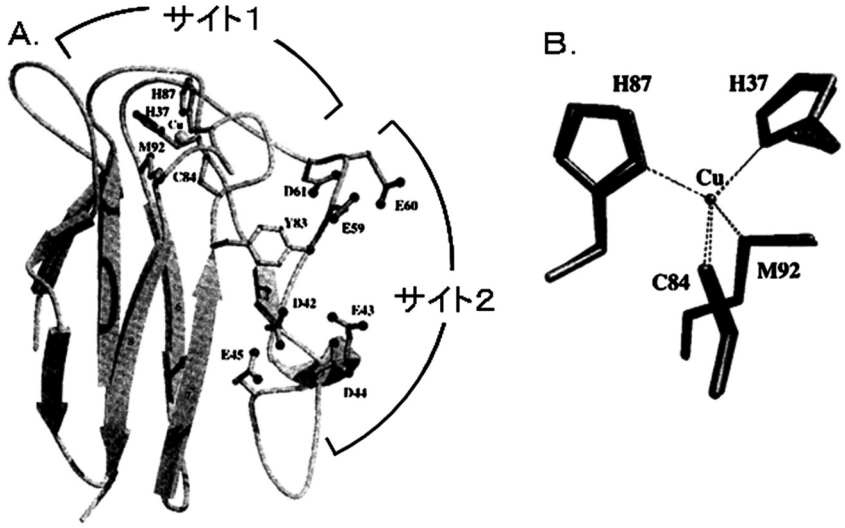



**図1**：X線構造解析から得られた高等植物（Silene）PCの立体構造[2)]
A．リボンモデル（Molscript[3)] およびRaster3D[4)] によって作画した）．B．銅原子と結合するアミノ酸残基の配置（MIDAS[5)] により作画した）．

## 3.d.3　チラコイド内腔へのPCの輸送

植物のPC遺伝子は核ゲノムにコードされており，PCアポタンパク質は細胞質で合成されて葉緑体チラコイド内腔まで輸送される．PCアポタンパク質はN末端部分に65−70個程度のアミノ酸残基からなる通過ペプチド（transit peptide）を持っており，Toc，Tic輸送システムによって葉緑体包膜を通過した後，N末端部分が切断されて中間サイズのPCとなる．中間サイズとなったPCは，バクテリア内膜の輸送体と相同性のあるsecA，secYE輸送体によってチラコイド膜を通過後，2回めの切断をうけて成熟型PCとなると考えられている[11)]．図2にPCの通過ペプチドのアミノ酸配列を示す．通過ペプチドのC末端側には疎水性アミノ酸のクラスターがみられる．この構造は大腸菌の外膜タンパク質の通過ペプチドとよく似ており，PCを大腸菌のペリプラズマに蓄積させて抽出・精製するのに利用できる[12)]．精製した成熟型PCアポタンパク質はin vitroで銅が組み込まれることが知られている[13)]．

## 3.d.4　植物からのPCの抽出法

PCは，硫安分画や種々のクロマトグラフィーなど，タンパク質の精製に一般的に用いられる方法を組み合わせて精製できる．PCを含む画分は，1 mM程度のフェリシアン化カリウムを加えることにより青色を呈するので，濃度が高ければ目視で確認できる．PCの純度は，278 nmの吸収と酸化型PCの吸収極大である597 nmの吸光度の比（$A_{278}/_{597}$）で見積もる．精製した高等植物のPCでは$A_{278}/_{597}$は1.0に近い値になるが，藻類やラン藻ではそれより高いこともあり，2.0を超える例も報告されている．PCは比較的安定なタンパク質で抽出・精製の操作を室温で行っても収率はあまり低下しないが，精製が進んだ段階での操作は低温で行うことが望ましい．精製したPCは，40%（v/v）グリセロールを含む10 mMリン酸緩衝液（pH 7.0）中で−20°C以下で凍結保存すれば，数年間は安定である．

### 3.d.4.1　葉緑体からのPCの抽出[14)]

PCは葉緑体チラコイド内腔でラメラ膜に比較的弱く結合しており，種々の処理で容易に可溶化することができる．したがって，多量のPCを必要としない場合，葉緑体を調製してから抽出することにより，不純物の少ない粗抽出液から精製を始めることができる．

(1)　根と葉を除いたホウレンソウの葉1 kgに対して冷やした緩衝液（0.4 Mショ糖，0.05 Mリン酸緩衝液　pH 7.0）2 Lの割合で加え，ミキサーで破砕する．
(2)　4層のガーゼでろ過した後，ろ液を3,000 xgで15分間遠心し，得られた沈殿を葉緑体画分とする．
(3)　葉緑体画分を1 Lの冷やした脱イオン水に懸濁した後，9 Lのアセトン（−20°C）を少量ずつよく撹拌しながら加える．
(4)　しばらく静置してから容器を傾けて上清を捨てた後，3,000×gで5分間遠心して得られた沈殿を風乾する．
(5)　乾いた沈殿を1 Lの10 mMリン酸緩衝液

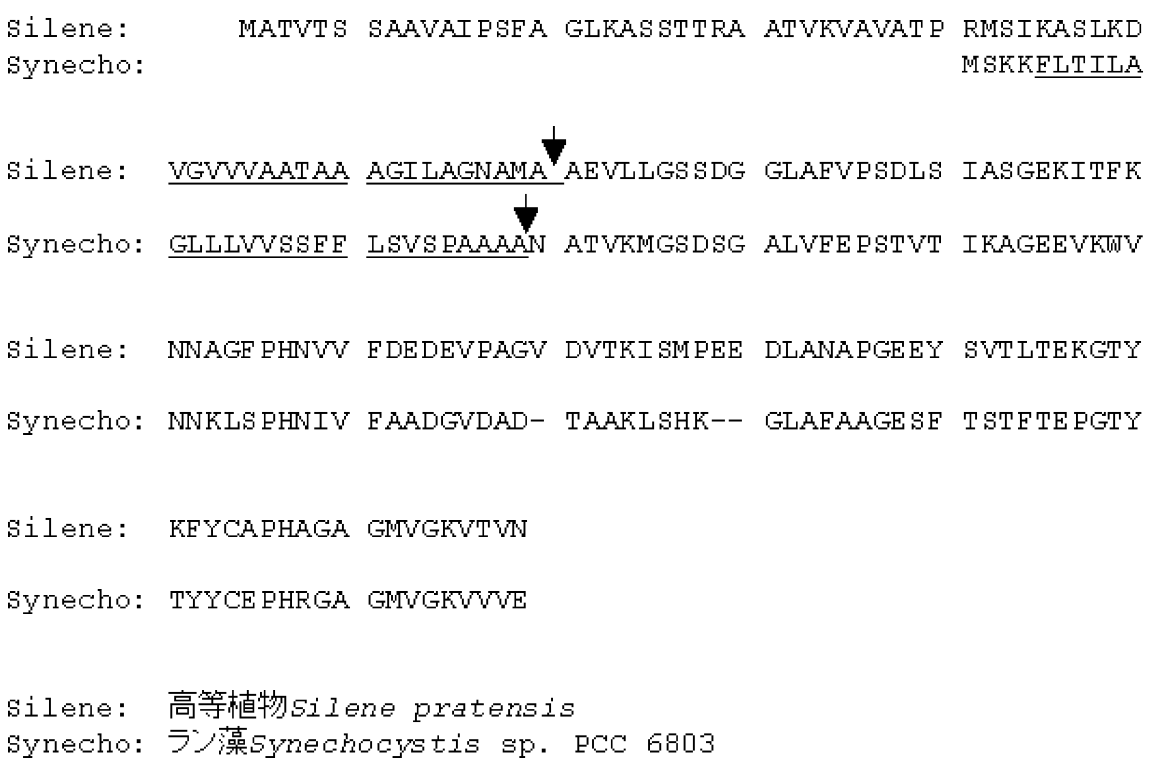



**図2**：PCの通過ペプチド（transit peptide）のアミノ酸配列
*Silene pratensis*（GenBank Accession No. X02965），*Synechocystis sp*. PCC 6803（GenBank Accession No. X54105）の翻訳産物のアミノ酸配列を元に作成した．矢印の部分でプロセシングが起こる．疎水性ドメインと考えられる部分を下線で示した．

（pH 7.0）に懸濁し1時間放置する．3,000×gで10分間遠心して得られる上清を粗抽出液とする．

#### 3.d.4.2 ホウレンソウの葉からのPCの抽出[15)]

⑴ ホウレンソウの葉6 kgに18 Lのアセトン（−30℃）を加え，ワーリングブレンダーで破砕した後，15分間静置する．

⑵ 破砕物を5,000×gで10分間遠心し，沈殿を室温で乾燥させ，アセトンパウダを得る．

⑶ 得られたアセトンパウダを12 Lの蒸留水に懸濁した後，5,000×gで10分間遠心し，不溶物を除去する．得られた上清を粗抽出液とする．

#### 3.d.4.3 PCの精製[15)]

⑴ PC粗抽出液を55%−90%飽和濃度で硫安分画する．

⑵ 得られた沈殿をできるだけ少量の10 mMリン酸緩衝液（pH 7.0）に溶かし，同じリン酸緩衝液で24時間透析する．

⑶ 透析したPC溶液に少量のフェリシアン化カリウムを溶かしてPCを完全に酸化させ，10 mMリン酸緩衝液で平衡化したDEAE-Sephacelカラム（4.5×20 cm）に吸着させた後，カラムに結合しない画分が溶出されるまで10 mMリン酸緩衝液で洗う．

⑷ 10–200 mMリン酸緩衝液（pH 7.0）で濃度勾配をかけてPCを溶出する．

⑸ $A_{278}/_{597}$を測定し，PCを多く含む画分を集め，10 mMリン酸緩衝液で透析する．

⑹ DEAE-Sephacelカラムによる分画をもう一度行い，$A_{278}/_{597}$が1に近い画分を集め，10 mMリン酸緩衝液で透析する．

⑺ 十分な純度のPCが得られない場合は，10 mMリン酸緩衝液で平衡化したSephadex G–100 column（2.5×120 cm）を用いてさらに精製するとよい．

### 3.d.5 ラン藻からのPCの抽出・精製[16)]

藻類やラン藻のなかにはPCをもたず，シトクロム*c*がシトクロム*f*と光化学系Ⅰとの間の電子伝達を行うものがある[17,18)]．PCとシトクロム*c*の両方の遺伝子をもつラン藻の場合には，培地の$Cu^{2+}$濃度が低下するとPCの蓄積量が低下するので，培地の$Cu^{2+}$濃度を高くして（4 $\mu$M $CuSO_4$程度）培養するとPCの収量が増加することがある[19)]．

#### 3.d.5.1 ラン藻からのPCの抽出

⑴ 定常期（$A_{600}$=1.6−1.8）の培養液を14,000×g

で遠心する(1 L の培養液から約 1–2 g の菌体が得られる)．得られた沈殿 250 g に対して 1 L の冷やした抽出緩衝液（1 mM PMSF（フェニルメタンスルホニルフルオリド），1 mM ベンズアミジン，1 mM ε-アミノカプロン酸，20 mM リン酸緩衝液，pH 7.0）を加えて懸濁し，暗所 4 ℃で 1 時間よく撹拌する．

⑵ 懸濁液を Manton-Gaulin high pressure continuous system（7000 psi）あるいは French pressure cell（Aminco, Silver Spring, MD, 140 MPa）に 3 回通して細胞を破壊し，3,000×g で 2 分間遠心して未破壊の菌体を除去する．

⑶ 得られた上清に終濃度 50 mM になるように固体の NaCl を溶かし，1 分間超音波処理した後，12,000×g で 20 分間遠心する．

⑷ 得られた上清をよく撹拌しながら，1/10 容の 0.1 M 硫酸ストレプトマイシン水溶液(pH 7.0)を加え，1 時間穏やかに撹拌した後，2 時間静置する．12,000×g で 20 分間遠心して不溶物を除去し，得られた上清を粗抽出液とする．

⑸ 粗抽出液を 50%－98%飽和濃度で硫安分画する(pH を 7.0 付近に保つ)．

⑹ *Synechocystis*PC のように酸性タンパク質の場合は，植物のときと同様に，DEAE-cellulose カラムを用いて精製する．また，*Nostoc*PC のように塩基性タンパク質の場合は carboxymethyl-cellulose カラムを用いて精製する．

## 3.d.6 大腸菌で発現させた PC の抽出・精製[20)]

PC の遺伝子を pET3d などの発現ベクターに組み込み，大腸菌で発現させる．PC 遺伝子のチラコイド通過ペプチドに対応する塩基配列を残したコンストラクトを作成し，大腸菌のペリプラズマに PC を蓄積させる．

### 3.d.6.1 大腸菌のペリプラズマに蓄積させた高等植物 PC の抽出

⑴ 組み換え体の大腸菌は適当な抗生物質を含む LB 液体培地で 30℃で培養し，$OD_{600}$＝0.6 となったところで終濃度 0.5 mM となるように IPTG（isopropyl 1-thio-β-D-galactopyranoside)を加え，16 時間培養する．培養中，4 時間おきに終濃度が 25 μM になるように培地に $CuSO_4$ を加えると PC の収量が増加する．

⑵ 菌体を 8,000×g で 10 分間遠心して回収する．

⑶ 菌体を 20% sucrose，2 mM EDTA を含む 20 mM Tris-HCl 緩衝液（pH 7.5）に懸濁し，10 分間置いた後，8,000×g で 10 分間遠心し，菌体を回収する．

⑷ 菌体を低張液（0.5 mM $MgCl_2$，1 mM $CuSO_4$ を含む 1 mM Tris-HCl，pH 7.5）に穏やかに懸濁し，ペリプラズマに蓄積している PC を細胞から遊離させる．8,000×g で 10 分間遠心し，菌体残渣を除き，得られた上清を粗抽出液とする．

### 3.d.6.2 PC の精製

⑴ 得られた上清を 60%－100%飽和濃度で硫安分画し，沈殿を少量の 20 mM Tris 緩衝液（pH 7.5）に溶かす．その溶液を Sephadex G-25 カラムに通して脱塩する．

⑵ 脱塩した溶液を 20 mM Tris 緩衝液（pH 7.5）で平衡化した DEAE-Sephacel カラム（5×10 cm）に吸着させた後，0 －0.5 M NaCl の濃度勾配で PC を溶出する．

⑶ PC を含む画分を濃縮し，50 mM NaCl を含む 20 mM Tris 緩衝液（pH 7.5）で平衡化した Sephadex G-100 カラム（2.5×120 cm）にのせ，同じ緩衝液で PC を溶出する．

⑷ PC を含む画分を集め，Tris 緩衝液で平衡化した TSK-gel DEAE-5PW カラムに吸着させ，20–300 mM NaCl の濃度勾配をかけた 20 mM Tris 緩衝液(pH 7.5)で PC を溶出する．$A_{278}/_{597}$ が 1.2 に近い画分を集めて濃縮し，凍結保存する．

## 3.d.7 定量法

### 3.d.7.1 分光測定法

酸化型 PC は青色を呈し，597 nm に主吸収帯をもち(図 3)，還元型 PC は可視部に全く吸収を持たない．高等植物 PC に含まれる銅原子の 597 nm におけるモル吸光係数は $4.5\times10^3\ M^{-1}cm^{-1}$ である[21)]．純化した PC 水溶液にフェリシアン化カリウムを加えて酸化型にしたときと，アスコルビン酸ナトリウムを加えて還元型にしたときの 597 nm の吸光度の差から PC の濃度を計算する．

### 3.d.7.2 電子伝達反応を利用した定量法

葉緑体から光化学系 I 複合体を調製し，光照射によってアスコルビン酸から PC と光化学系 I を経て $NADP^+$ が還元される反応，または還元されたメチルビオローゲンが酸素を消費する反応を測定する[22)]．既知量の精製した PC による反応と比較することにより，試料中の PC 量を定量することができる．また，シトクロム *c* の光酸化反応が PC に依存することを利用して PC を定量する

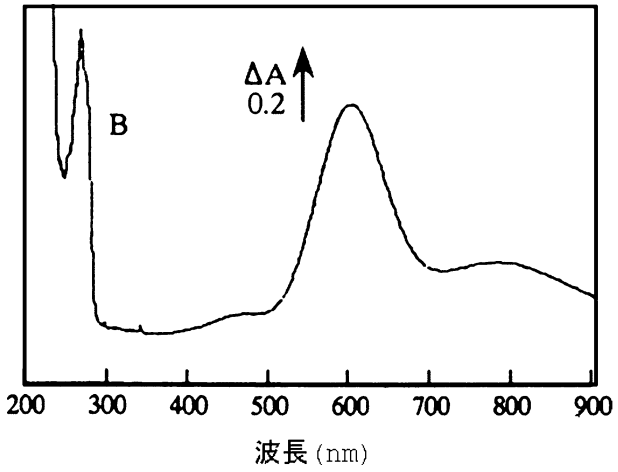



図3：高等植物（Silene）の酸化型 PC の吸収スペクトル
597 nm に主吸収帯をもち，他に 770 nm と 460 nm に吸収を示す．

ことができる[23]．これらの方法は，不純物による影響が少ないので粗抽出液中の PC の定量に適している．

#### 3.d.7.3 EPR 測定

酸化型 PC の，150 K における EPR スペクトルを図 4 に示す．$g_{||}$ の 4 本に分かれたシグナルは葉緑体の EPR を測定しても得られるので[24]，このシグナルの大きさを既知量の精製した PC のものと比較することにより，葉緑体内の PC の量を知ることができる．$g_{||}$ シグナルは，Cu(II)と，これに結合する Cys 残基との間の非局在化に由来すると考えられており[25]，銅原子周辺の構造を分析するのにも用いられる．

### 3.d.8 活性測定法

#### 3.d.8.1 シトクロム *f* と PC との間の電子伝達反応の測定[26]

測定は，ストップドフロー分光光度計を用いて行う．シトクロム *f* は使用直前にフェリシアン化カリウムで酸化させるか，あるいはジチオスレイトールで還元させた後，Sephadex G-25（2×30 cm）を通して過剰な酸化剤および還元剤を除去する．0.3 μM シトクロム *f* 溶液（0.19 M NaCl，10 mM リン酸緩衝液，pH 7.0）に対して 8 倍から 100 倍濃度の PC を用い，シトクロム *f* の 422 nm の吸光度変化を室温（20°C）でモニタする．反応速度はシトクロム *f* の偽一次反応として解析する．

#### 3.d.8.2 PC と光化学系 I との間の電子伝達反応の測定[27]

光化学系 I 反応中心 P700 の光酸化とそれに続く暗所での PC による再還元を測定する．二波長分光光度計を用いて，750 nm をレファレンス光，697 nm を測定光とし，吸光度変化をモニタする．タングステンランプなどの光源から 550 nm 以上の光および赤外線をカットして反応光とし，フォトマルの手前で測定光以下の波長の光をカットする．0.25 μM P700 に相当する光化学系 I 複合体，3 μM PC の溶液（2.5 mM アスコルビン酸を含む 10 mM Tris-HCl，pH 8.0）を用い，P700 の還元反応を解析する．光化学系 I 複合体の調製によって持ち込まれる界面活性剤（Triton X-100 など）の溶液中の濃度は 0.001%以下となるようにする．光源として Nd：YAG レーザーからの 532 nm の閃光を用い，ダイオードレーザーで 830 nm の吸光度変化を測定する方法も報告されている[28]．

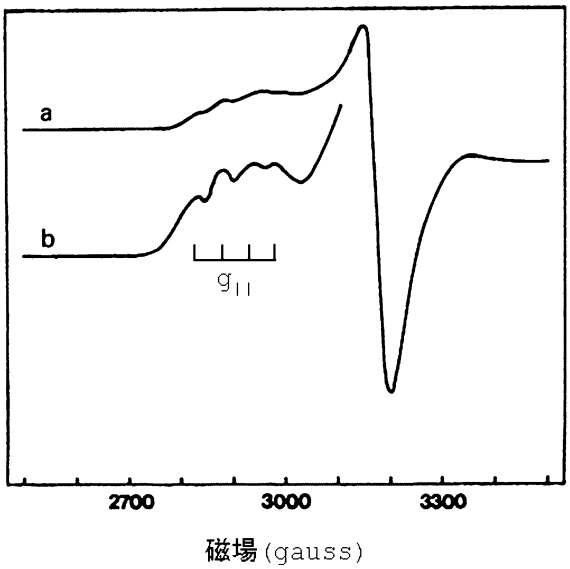



図4：高等植物 PC（Silene）の EPR スペクトル
a：スペクトル全体．b：$g_{||}$ シグナルの近傍を縦軸のスケールを 3 倍にして示した．

## 参考文献


1）S. Katoh, Photosynth. Res. **76** (2003) P.255.
2）H. Sugawara, T. Inoue, C.-M. Li, M. Gotowda, T. Hibino, T. Takabe, & Y. Kai, J. Biochem. **125** (1999) P. 899. (1999).
3）P. J. Kraulis, J. Appl. Crystallogr. **24** (1991) P.946.
4）E. A. Merritt & M. E. P. Murphy, Acta Crystallogr. **D50** (1994) P.869.
5）T. E. Ferrin, C. C. Huang, L. E. Jarvis, & R. Langridge, J. Mol. Graphics **6** (1988) P.13.
6）M. Hippler, F. Drepper, W. Haehnel, & J.-D. Rochaix, J. Biol. Chem. **275** (2000) P.17590.
7）M. A. De la Rosa, Photosynth. Res. **75** (2003) P.97.
8）M. Hervas, J. A. Navarro, & M. A. De la Rosa, Acc.

Chem. Res. **36** (2003) P.798.
9）A. B. Hope, Biochim. Biophys. Acta **1456** (2000) P.5.
10）M. A. De la Rosa, J. A. Navarro, A. Diaz-Quintana, B. De la Cerda, F. P. Molina-Heredia, A. Balme, P. S. Murdoch, I. Diaz-Moreno, R. V. Duran, & M. Hervas, Bioelectrochemistry **55** (2002) P.41.
11）A. Di Cola, E. Klostermann, & C. Robinson, Biochem. Soc. Trans. **33** (2005) P.1024.
12）T. Hibino, B. H. Lee, & T. Takabe, J. Biochem. **116** (1994) P.826.
13）T. Hibino, A. Douwe de Boer, P. J. Weisbeek, & T. Takabe, Biochim. Biophys. Acta **1058** (1991) P.107.
14）加藤栄,「光合成研究法」, 共立出版, 1981, p.318.
15）T. Takabe, S. Niwa, & H. Ishikawa, J. Biochem. **87** (1980) P.111.
16）J. A. Navarro, M. Hervas, & M. A. De la Rosa, Photosynthesis Research Protocols, ed. R. Carpentier, Humana Press, 2004, p.75.
17）G. Sandmann, H. Reck, E. Kessler, & P. Boeger, Arch. Microbiol. **134** (1983) P.23.
18）G. Sandmann, Arch. Microbiol. **145** (1986) P.76.
19）M. Hervas, F. Navarro, J. A. Navarro, S. Chavez, A. Diaz, F. J. Florencio, & M. A. De la Rosa, FEBS Lett. **319** (1993) P.257.
20）B. H. Lee, T. Hibino, T. Takabe, P. J. Weisbeek, & T. Takabe, J. Biochem. **117** (1995) P.1209.
21）J. A. M. Ramshaw, R. H. Brown, M. D. Scawen, & D. Boulter, Biochim. Biophys. Acta **303** (1973) P.269.
22）G. A. Hauska, R. E. McCarty, R. J. Berzborn, & E. Racker, J. Biol. Chem. **246** (1971) P.3524.
23）M. Plesnicar & D. S. Bendall, Biochim. Biophys. Acta **216** (1970) P.192.
24）R. Malkin & A. J. Bearden, Ann. N. Y. Acad. Sci. **222** (1973) P.846.
25）E. I. Solomon & M. D. Lowery, Science **259** (1993) P.1575.
26）S. Niwa, H. Ishikawa, S. Nikai, & T. Takabe, J. Biochem. **88** (1980) P.1177.
27）T. Takabe, H. Ishikawa, S. Niwa, & S. Itoh, J. Biochem. **94** (1983) P.1901.
28）M. Nordling, K. Sigfridsson, S. Young, L. G. Lundberg, & O. Hansson, FEBS Lett. **291** (1991) P.327.

# 3．酵素・電子伝達成分の精製・活性測定・定量
## e．プラストキノン

柴田　　勝[1)]

プラストキノンは，光合成電子伝達系の光化学系IIとシトクロム $b_6/f$ 複合体を仲介する電子伝達体として機能しており，その酸化還元状態により反応中心などのタンパク質の転写が調節されている[1,2,3]．本章では，緑葉，葉緑体からの酸化型・還元型プラストキノン類の一般的な抽出・分析方法に加え，微量試料での定量法について紹介する．

## Analysis of Plastoquinones in Green Leaves

Masaru Shibata

Plastoquinone is a major plant quinone in chloroplasts, and its function in photosynthesis is to act as electron redox-mediator between PSII and cytochrom$b_6$/f complexes and hydrogen pump across the thylakoid membranes. Many cellular responses to variable environments are carried out *via* the redox state of the plastoquinone-pool as function of a redox sensor in chloroplasts. In this chapter, I introduce plant quinone analytical methods with high performance liquid chromatography which has high sensitive and selective methods. Biosynthesis, principle of analysis and quinone determination of plastoquinones have been described.

### 3.e.1　プラストキノンの種類

プラストキノン（2, 3-dimethyl-6-multiprenyl-1, 4-benzoquinone）は，酸化還元反応を行うベンゾキノン環の6位に側鎖としてイソプレニル誘導体が結合した構造を持つ．イソプレニル基（$C_5$）を単位として，その数が9，4，3のプラストキノンが知られており，それぞれPQA-9，PQA-4，PQA-3として記されている（図1）．従来，論文等では側鎖の炭素数を明示するために側鎖炭素数が45個のPQA-9をPQA-45や$PQA_{45}$として表記されてきたが[4,5]，近年はイソプレン単位を基本として示すのが一般的である[6]．

全ての緑色植物の葉にはプラストキノンが存在しており，葉令や生育条件によりその含量は大きく変動するが，その中でPQA-9が量的に最も多く，重量比でクロロフィルの10～50%程度相当する量が含まれている[4,5,6,7,8]．葉内のプラストキノンは，葉緑体のチラコイド膜，包膜およびプラストグロビュール顆粒に蓄積していることが知られている[9,10]．主な機能として光合成電子伝達系の光化学系IIとシトクロム$b_6$/f複合体の電子伝達の仲介を行い，その酸化還元レベルは転写制御のシグナル[3]として働いている．また，光化学系IIの$Q_A$成分や直接的な活性酸素のクエンチングなど，その機能は多岐に渡っている．電子伝達に関与するキノン蓄積（プール）は，電子プールとして知られており，主成分はチラコイド膜のPQAである[11]．これらのことから特に言及されていない限り，論文等のプラストキノン類はPQA-9を示している．本章では以後，PQA-9を主な分析対象として紹介する．

プラストキノンは，側鎖の構造の違いにより3種類に大別することができ，最も一般的なA型のプラストキノン（PQA）に加えてB型（PQB），C型（PQC）がある（図1）[4,12]．イソプレン側鎖の1つにOHが付加したものがPQCであり，OHの結合位置により6つの異性体（$PQC_1$～$PQC_6$）に分類されている．また，PQCのOH基に脂肪酸（$C_6$～$C_{18}$）がエステル結合したものがPQBであり，それぞれが$PQB_1$～$PQB_6$に対応している[4]．PQA以外のマイナーPQ成分として，側鎖長の短いPQA-4がセイヨウトチノキの緑葉[13]に見出されており，また，ホウレンソウにも$PQC_{1-4}$，$PQC_{5,6}$，PQBが全キノン類の1%程度，存在している[12]．これらのプラストキノン類のうちで，比較的機能が明確になっているのがPQAであり，その他のものについてはあまり研究が行われていない．

### 3.e.2　プラストキノンの生合成

プラストキノンは葉緑体において，ベンゾキノン環に

1）長岡工業高等専門学校物質工学科

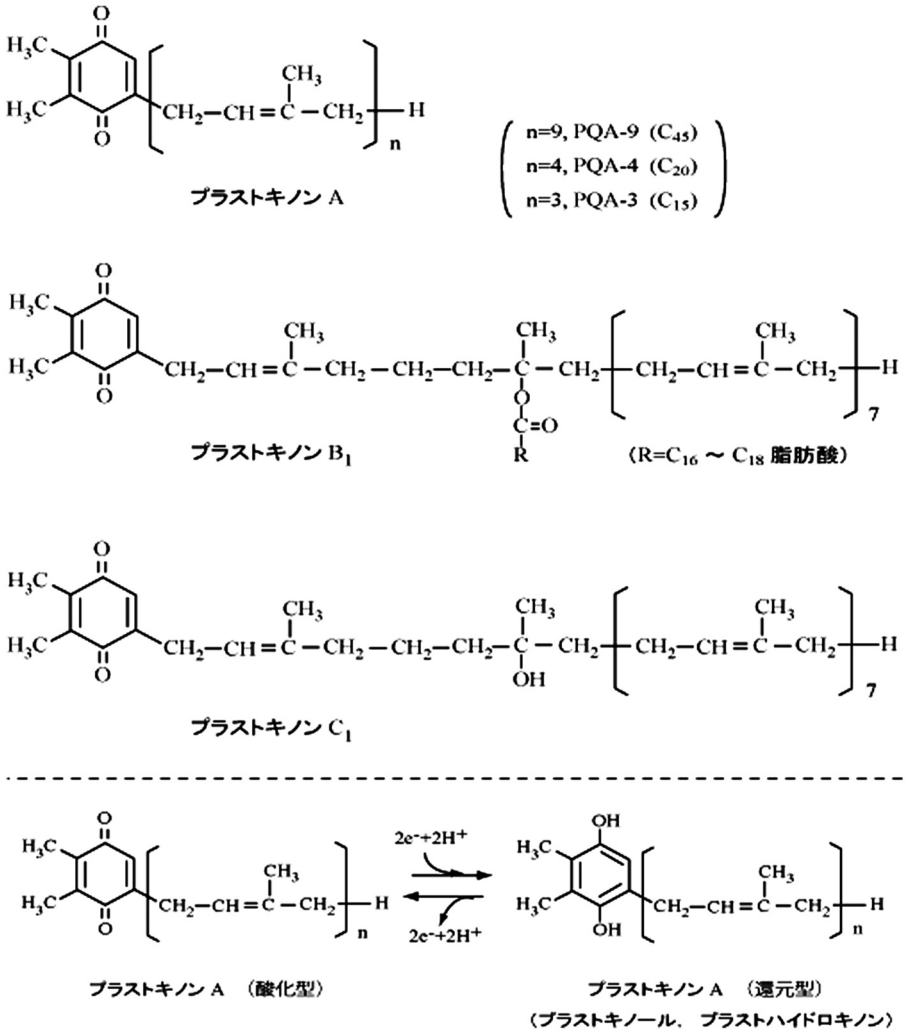



図1：プラストキノン A，B，C の構造と酸化還元反応

側鎖のイソプレニル基が転移し，合成される（図2）[14,15,16]．葉緑体の植物キノン類は，光化学系 I の $A_1$ のフィロキノン，抗酸化物質のトコフェロール，電子伝達体のプラストキノンがあり，その合成経路の多くが共通している．ベンゾキノン環は，シキミ酸からコリスミ酸を経てホモゲンチジン酸から合成される．包膜でホモゲンチジン酸にイソプレン（$C_5$）が 9 個縮合した $C_{45}$ のソラネシルピロリン酸（solanesyl pyrophosphate）が脱炭酸と共に転移し，2-メチル-6-ソラネシルキノール（2-methyl-6-solanesylquinol）となる．次いでベンゾキノン環のメチル化[17]が行われ，プラストキノンの還元型であるプラストキノールが合成される．生合成は，酸化型ではなく全て還元型を基質として行われており，酸化型では各反応は起こらない[15]．

プラストキノン側鎖のイソプレノイドは，細胞質・ミトコンドリアでのアセチル-CoA を出発物質とするメバロン酸経路とは異なり，葉緑体・色素体でのピルビン酸・グリセルアルデヒド-3-リン酸を出発物質とする非メバロン酸経路により合成されている（図2）[18,19]．

## 3.e.3 プラストキノン分析

プラストキノン[注1]は，酸化型，還元型でその吸収スペクトルが異なることから，キノン同定は主に紫外域の酸化還元差スペクトル，高速液体クロマトグラフィー（HPLC），薄層クロマトグラフィー（TLC）により行われている．小型の葉や変異体などでは，得られる試料量

[注1] PQA-9 は市販されているが，マイナープラストキノンの標準物質の入手は困難であることから，TLC などにより精製する必要がある．PQA-9 を含め，主なプラストキノン類ならば，キノンを研究している研究室から分譲してもらうのが純度や濃度の信頼性の点から確実である．

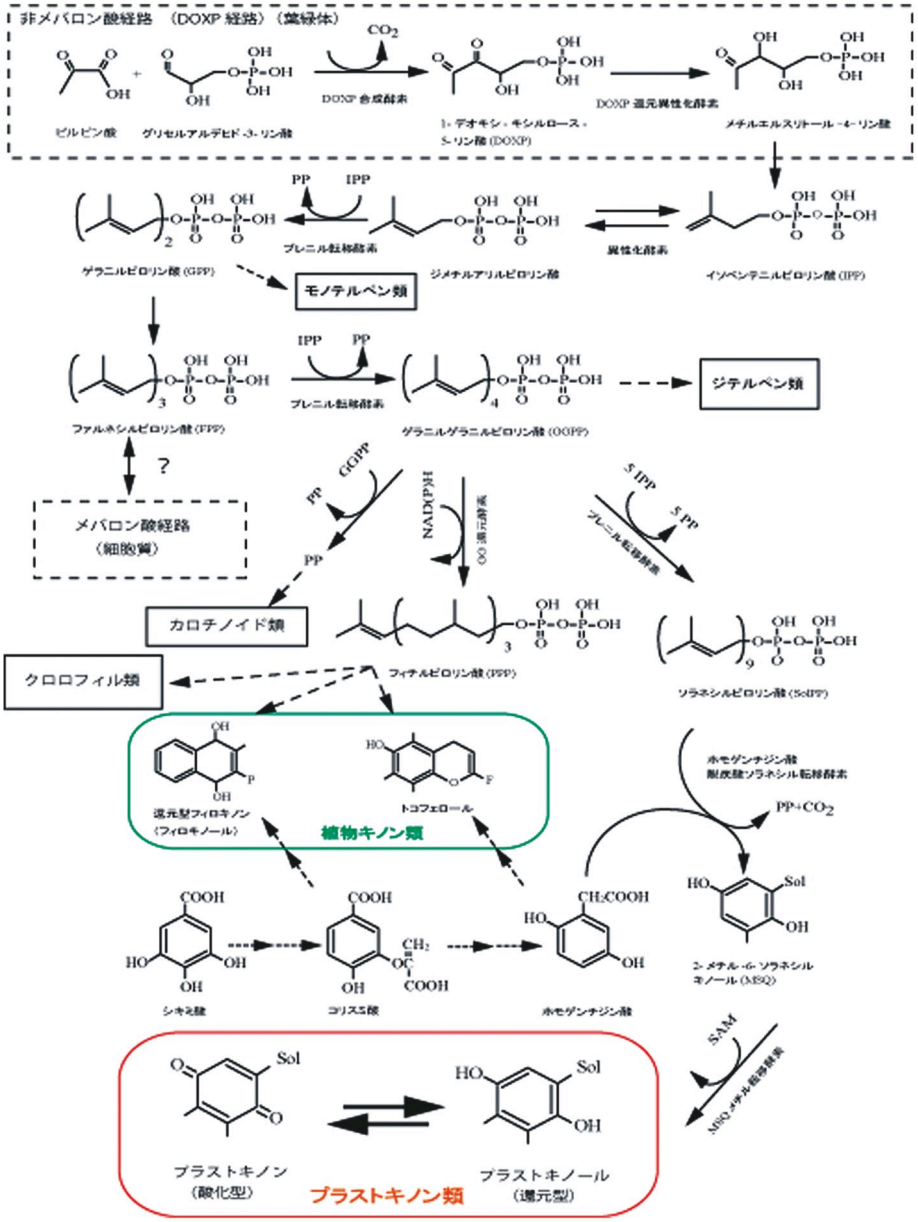



図 2：葉緑体のプラストキノンの合成経路

が限られていることから，極微量試料（10 mg 以下）によるプラストキノン測定についても紹介する．

### 3.e.3.1　酸化還元差スペクトルの測定操作

プラストキノンは，酸化型が 255 nm，還元型が 290 nm に吸収極大を示す．微量の不純物を含むプラストキノンや分画フラクションのキノンの定性定量を行うには吸収法ではなく，酸化還元差スペクトルにより行う（表 1，図 3）．酸化型プラストキノンは 255〜260 nm に吸収帯があり，還元型ではその吸収が消失する（図 3）．緑葉には，キノン類としてトコフェロール，フィロキノン，ユビキノンがあり，トコフェロール，ユビキノンの還元型の吸収スペクトル（極大 290 nm）はプラストキノンの還元型と類似しているが，その酸化型の吸収帯が大きく異なることから，酸化還元差吸収スペクトルにより定性を行う．プラストキノンの吸収スペクトルは側鎖の種類や長さにより影響を受けないことから[4]，全てのプラストキノン種に対して同様な手順により定量を行うことができる．

表 1：プラストキノンの吸収とモル吸光係数（エタノール中）

| プラストキノン | 吸収極大波長 (nm) | モル吸光係数 ($mM^{-1}cm^{-1}$) | 文献 |
|---|---|---|---|
| 酸化型 | 255 | 17.9 | 3),30) |
| 還元型 | 290 | 3.4 | 3),30) |
| 酸化還元差 | 255 | 15.0 | 3),22) |

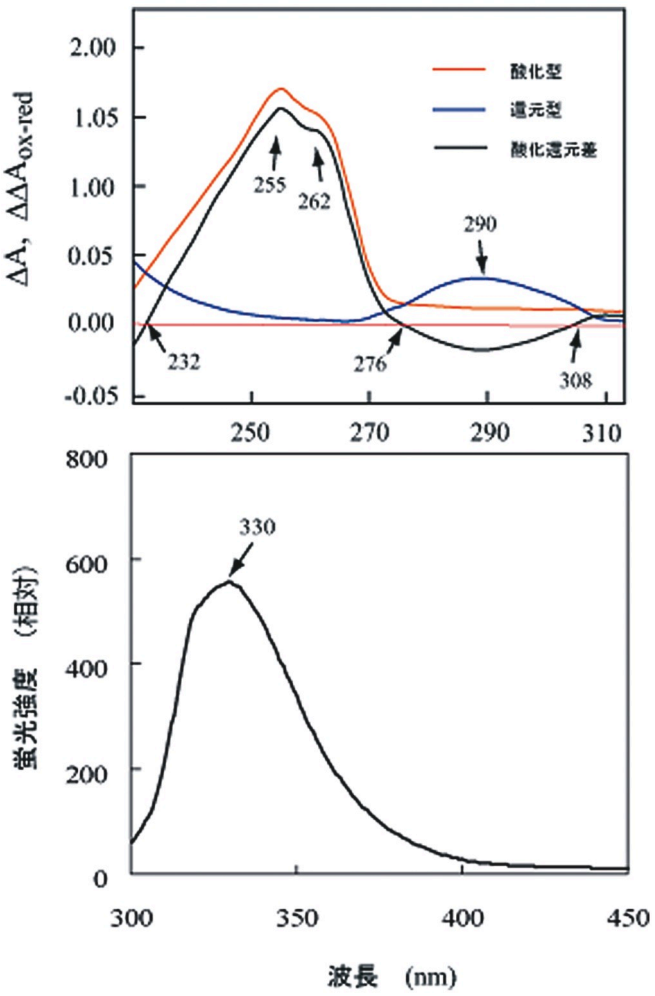



**図3**：プラストキノンのスペクトル
㈠酸化型，還元型および酸化還元差スペクトル(エタノール中)
㈡還元型プラストキノンの蛍光スペクトル（290 nm 励起）

溶液中の酸化型プラストキノンの定量を以下の1～3操作により行い，還元型を含む全プラストキノン量に対しては4，5操作により測定する．

[実験操作]

1．プラストキノンを含むエタノール溶液の吸収スペクトルを 220～340 nm の範囲で測定する[注2]．
2．次にエタノール溶液 1.0 ml に対して水素化ホウ素ナトリウム（$NaBH_4$）を数粒（極微量，数 μg 程度）添加し[注3]，プラストキノンをプラストキノールに還元する．ゆっくり攪拌し，20 秒後に再度，吸収スペクトルを測定する．キノン還元は比較的速く行われるが，条件により時間がかかる場合があるので，数回，スペクトル測定を行い，変化がなくなるまで繰り返し測定する．スペクトル変化がなくなれば，全てのキノンが還元されたとみなす（図3）．
3．255 nm の還元前の吸光度（ΔAox）と還元後の吸光度（ΔAred）の差を酸化還元差モル吸光係数 15.0（$mM^{-1}cm^{-1}$）[注4] を用いてプラストキノン濃度を求める（表1）[4,12,20]．

$$\text{プラストキノン(mM)} = \frac{\Delta Aox - \Delta Ared}{15}$$

4．試料中に還元型プラストキノン(プラストキノール，プラストヒドロキノン）が混在する場合は，試料のエタノール溶液に最終濃度が 1 mM となるように $FeCl_3$ を加えて，攪拌し，1分間放置してキノールの酸化を行う．
5．次いで，等量の石油エーテル（またはヘキサン）と適量の蒸留水を加えて混合し，キノンを含む石油エーテル層を分離する．エーテル層を他のチューブに移し，エタノール水層を等量の石油エーテルで再抽出する．2つの石油エーテル抽出液を合わせて，数回，蒸留水で Fe を取り除いた後，減圧乾固する(水分が多ければ抽出エーテル層を無水硫酸ナトリウムにより脱水する)．これをエタノールに再溶解させることで，ほとんど全てのプラストキノンは酸化型となる．本操作後にプラストキノンの酸化還元差スペクトルから溶液中の酸化型プラストキノン定量を行い，全プラストキノン量（酸化型＋還元型）を求める．

### 3.e.3.2　緑葉・葉緑体からのプラストキノンの抽出

プラストキノンは，疎水的であることから緩衝溶液ではなく有機溶媒による効率的な抽出を行う．一般的な抽出溶媒として，エタノール，エーテル，ヘキサン，アセトン，クロロホルム/メタノールなどがある．葉片の抽出溶液をプラストキノンのみではなく，他の色素類の測定の分析にも使用する場合は，極性有機溶媒のアセトンや複数の混合有機溶媒で抽出されることが多い．また，抽出操作中の酸化分解など防ぐために，抽出溶媒の冷却や脱気，窒素パージによる溶存酸素の除去，そして *t*-buthyl-p-hydroxytoluene（BHT），グルタチオン，アス

[注2] 試料・標準物質が微量である場合，全ての操作を分光光度計のセル内で行う．
[注3] プラストキノンは比較的安定であるが，過剰な水素化ホウ素ナトリウムの添加により分解する．また，分光光度計のセル内で水素が発生し，気泡の付着によりスペクトルが乱れることがあるので注意すること．
[注4] 酸化還元差スペクトルはエタノール中で 233，276，308 nm の3箇所で ΔΔA が 0（isobenstic point）になるため，これらの波長は差スペクトルの確認に用いる．

コルビン酸などの抗酸化物質の添加により抽出時の酸化抑制を行う場合もある．一方，高濃度の抗酸化物質（還元剤）によるキノンの還元も知られており[注5]，キノンの酸化還元状態を調べたい場合は，抽出時の酸化還元反応，試料の保存性が問題となる．これらのことから，抽出溶媒と安定化剤の種類・濃度を選択しなければならない．

抽出効率や溶媒の扱いやすさから，葉片のプラストキノンの定性・定量分析を行うには，緑葉からアセトンまたは酢酸エチルにより抽出を行う．抽出溶媒としてのアセトンはプラストキノン抽出の効率が良く，材料中のプラストキノンをほとんど完全に抽出できるが，クロロフィルやその他の極性脂質も同時に多量に抽出されるために，その後の操作として適切な分離・分析条件の設定が必要であり，得られるキノンの純度や定量性が問題となる場合がある．石油エーテルやヘキサンによる抽出は，クロロフィルなどの雑物質の共抽出を抑制することができることから，その後の精製操作が簡便になり，また，水溶性抗酸化物による酸化型キノンの還元を抑えることができる．しかし，条件によりキノン抽出が不安定となるために幾分，定量性に欠ける．

葉緑体からキノン抽出を行う場合，葉緑体を脱イオン水に懸濁してアセトンやメタノールで抽出するか，凍結乾燥後石油エーテルやヘキサンなどで抽出を行う．

### ［抽出法１］少量の葉片からの抽出[注6,注7]

本節では，抗酸化物質を加えない冷却したアセトンによる抽出を基本として説明する．必要な場合，アセトンにグルタチオン[注8]またはBHTを加える．

1．乳鉢を用いて植物組織（50〜100 mg）を液体窒素内で破砕し，アセトンを加え，抽出する．
2．マイクロチューブに移し，5,000 xgで5分間遠心後，上清を他のマイクロチューブに移し，残渣に250 μlアセトンを加えてボルテックス後，再遠心により上清と残渣に分離する．上清を先程の上清に加え，再度，残渣に250 μlアセトンを加え，キノン抽出を行う．全てのアセトン抽出液を混合し，抽出溶液の重量測定（空のマイクロチューブ重量を差し引く）後，アセトンの比重0.79 g/mlから抽出溶液量を計算する．全量で約1.0 ml程度になる．本抽出により葉内の98%以上のプラストキノンの抽出が可能である．
3．キノンの酸化，分解を抑えるために，マイクロチューブをアルミホイルで遮光する．すぐに，測定を行わない場合は−20°C以下で冷凍保存する．

### ［抽出法２］葉緑体・チラコイド膜からの抽出・濃縮Ⅰ（色素類を含む全抽出）

1．200 gのホウレンソウの葉から調整した葉緑体を15 mlの脱イオン水に懸濁する．
2．攪拌しながら200 mlのアセトンに加える．5分間攪拌後，濾過して緑色のアセトン抽出液を分離する．さらに100 mlのアセトンで2回，200 mlの石油エーテルで1回抽出を行う．本操作で残渣にはほとんど緑色がない状態となる．
3．全ての抽出液を合わせ，200 mlの脱イオン水を徐々に加えて石油エーテル層を分離させる．石油エーテルを除き，アセトン ── 水相に再度，石油エーテルを100 ml加え攪拌後，石油エーテル層を分離する．
4．エーテル層を先程の抽出エーテルに合わせ，無水硫酸ナトリウムで脱水後，ロータリーエバポレーターなどで減圧乾燥（40°C以下に設定）する．

### ［抽出法３］葉緑体・チラコイド膜からの抽出・濃縮Ⅱ（共雑物質を抑えた抽出）

1．葉緑体を凍結乾燥し，クロロフィル1 mg当たり10 mlの石油エーテルを加える．
2．大型のガラスホモゲナイザーか乳鉢中で固まりがないように分散させた後，ビーカーに移し10分間攪拌する．遠心または濾過して黄色の石油エーテル抽出液を分離する．
3．この抽出操作を2回くり返し，得られた抽出液をいっしょにして，ロータリーエバポレーターなどで減圧乾燥（40°C以下に設定）する．

---

[注5] 酸化型プラストキノンは30 mMアスコルビン酸を含む90%アセトン水溶液中で，常温，5分間の攪拌により，一部ではあるが還元型になることが知られている[21]．グルタチオンでは還元されない．酢酸エチル中でのプラストキノンの安定性は高く，高濃度のアスコルビン酸を含む場合でも酸化型を還元させず，また，無添加の状態においても常温で還元型の酸化があまりみられない．また，抽出効率も非常に高く，アセトンと同程度である．

[注6] 葉片からのアセトン抽出では，ワックス状物質が抽出液中に混在して精製の操作が困難になる時があるために，葉緑体から抽出したほうがその後の操作しやすくなる．葉緑体はホウレンソウの葉から常法に従って調整すればよいが，粗標品で十分である．

[注7] シロイヌナズナなどの薄い葉の場合，ビーズ破砕で定量的な抽出が可能である．

[注8] 90%アセトン水溶液に高濃度アスコルビン酸を添加すると酸化型の一部が還元されてしまうが，グルタチオンではその心配はない．

［抽出法 4］チラコイド膜からの簡易抽出

1．0.1 μmol 程度のクロロフィルを含む葉緑体溶液 100 μl に等量の蒸留水を加え攪拌後，冷えた 300 μl のアセトンを加え，攪拌後遠心する．
2．上清を別のマイクロチューブに移し，残渣に 300 μl アセトンを加え，攪拌後遠心し，再度，残渣に 300 μl アセトンを加えて，再抽出する．残渣に緑色が残っていたら，再度，アセトン抽出を行う．
3．全てのアセトン抽出溶液を合わせ 80%アセトン比重（0.82 g/ml）から抽出溶液量を計算する．全量で 1.0 ml 程度になる．本抽出により葉内の 98%以上のプラストキノンの抽出が可能である．

### 3.e.3.3 TLC によるプラストキノンの分画

プラストキノン分画は，粗抽出液を酸性アルミナ（8％不活性化）のカラムクロマトグラフィーとシリカゲルの薄層クロマトグラフィー（TLC）により行う．ただし，アルミナカラムによる分画操作では，還元型キノン（キノール）が全て酸化型になるために，精製を通じての酸化還元比を求めることはできない．PQB，PQC 異性体の分離に関しては Barr & Crane（1971）に詳しく記述されているので，参照されたい．本項では，TLC による PQA，PQB，PQC までを紹介する．

1．アルミナ（アルミニウムオキシド活性型，酸性，カラムクロマトグラフィー用，Merk）100 g に脱イオン水 8 ml を加えて攪拌する．この際，発熱するが常温にもどってから石油エーテルに懸濁して湿式でクロマト管に充填する（3×15 cm）．（石油エーテルは揮発しやすいのでドラフトチャンバー内で操作）
2．乾燥抽出物を石油エーテル（5〜10 ml）に溶解させる．クロロフィルを含む場合は，少量のジエチルエチルエーテル（1〜2 ml）に溶解してから 10 倍量の石油エーテルで薄める．
3．これをカラムに添加吸着後，それぞれ 50 ml ずつの石油エーテルとエチルエーテルの混液[注9]で展開する．両者の割合は(1) 100：0，(2) 100：2，(3) 100：5，(4) 100：10，(5) 100：20 で，この順に添加する．(2)と(3)で溶出される画分に PQA と PQB が，(5)で PQC が溶出される．各画分の PQ の有無は紫外部の酸化還元差スペクトルにより行う．
4．PQA と PQB を含む画分と PQC を含む画分はそれぞれ別々に濃縮して，別々のシリカゲルプレート（20×20 cm）に線状に塗布する．次いで，クロロホルム－イソオクタン（80：20）で展開する．プラストキノン類の $R_f$ 値はそれぞれ PQA＝0.9，PQB＝0.8，$PQC_{1-4}$＝0.4，$PQC_{5,6}$＝0.3 である．各キノンの位置はロイコメチレンブルーで検出する．検出はプレートの片端で行ない，その他の部分は濾紙かガラス板で覆うことでメチレンブルーが噴霧されないようにする．
5．還元型のメチレンブルー（ロイコメチレンブルー）により発色させる．ロイコメチレンブルーの調整として，50 ml 0.1%メチレンブルーアルコール溶液，1.0 g 亜鉛末，1.0 ml 濃硫酸を加えて軽く攪拌してから 10 分以上静置する．亜鉛粉末が沈殿しているために，ガラスウールなどを用いて亜鉛粉末を除いてから用いる．
6．TLC で分離後，ロイコメチレンブルーをスプレーし発色させる．本発色剤は，キノンの反応性により還元型メチレンブルーを酸化し青色変化することを利用している．ロイコメチレンブルーは空気中の酸素によっても酸化されるために，スプレー後，バックグラウンドの青色が徐々に強くなるために手際良く，スポットを可視化する．
7．発色溶液がかかっていない TLC 部分を掻き出し，エタノールにより溶出させる．PQC と PQB はそれぞれ異性体の混合物である．異性体を分離するには，さらに別の展開溶媒で TLC を行う必要がある．PQA は 5〜10 ml の熱エチルアルコールに溶かし，冷凍庫中に放置すると結晶になる．

### 3.e.3.4 HPLC によるプラストキノンの測定

抽出溶液のキノン定量には，紫外（UV）検出器による高速液体クロマトグラフィー（HPLC）が用いられてきた．しかし，プラストキノンなどの植物キノン類の測定には，紫外部に大きな吸収を示すクロロフィルやカロチノイドなどの色素類が抽出溶液に混入することから，キノン種やその濃度によっては定量的な分析ができない[12,23]．このために植物葉片のキノン分析では前処理や分析法の工夫が行われてきた．前処理として①アルミナカラムによる色素除去，② $FeCl_3$ などの酸化剤を用いてキノン還元体を色素類と分離しやすい酸化体へ変換させてから全量測定すること，などがある．また，分析法の改良として③ HPLC によりキノンを分離後，$NaBH_4$ などの還元剤により蛍光性を有する還元型キノン（キノール）に反応させ，蛍光検出器[24]により検出する分析法がある．これらの方法は前処理の煩雑さや反応試薬によるキノン分解，急激な分離カラムの劣化などが起こりやす

[注9] 夏季，空調のない実験室では石油エーテルがカラム内で気化し，内部のアルミナ層が乱れるので注意すること．

い．これらの問題点を解決する方法として④キノン類の酸化還元電位を選択的に検出可能な電気化学検出器（ECD）を用いた分析が行われてきた[12,25]．しかし，ECDは，特殊な検出器であることからPQ類定量を迅速・簡単に行うための障壁となっている．これらのことから，一般的な紫外―可視吸光度検出器による検出に加えて，キノンに対して特異性が高く，高感度なon-line法の一種であるポストカラム還元法について紹介する．

ポストカラムキノン還元法は，フィロキノンの分析を中心に進歩してきたが，基本的な操作はプラストキノン分析に応用することができる．まず，ポストカラム還元法はその還元方法により3つに大別される．（A）白金黒カラムを用いたカラム還元法[26]，（B）電気化学的還元法[27]，（C）$NaBH_4$などの還元剤を用いた化学的還元法[24,28,29]．その中で白金黒カラムを用いたカラム還元法と$NaBH_4$を用いた化学的還元法について具体的な条件を記す．

また，より簡単な系によるHPLC分析として検出器に吸光検出器と蛍光検出器を組み合わせた方法についても記述する．

### [キノン類の分離条件]

プラストキノンはその側鎖の性質から，キノン分離に対して逆相カラムを用いたHPLCにより行う（表2）．分離カラムとして逆相カラムODS，溶離液にメタノールやエタノールを用いてキノン類を分離[注10]する．エタノールの比率を高くすると，プラストキノンの溶出が早くなり，分析時間が短縮されるが，比較的早くに溶出する還元型が他の物質のピークと重なり，キノンの定量の妨げとなる場合がある．

植物葉片のキノン類の側鎖の炭素数はトコフェロールが$C_{15}$，フィロキノンが$C_{20}$と短く，還元型プラストキノンより早くに溶出する．しかし，ユビキノン-9,10の側鎖は$C_{40}$，$C_{45}$であることからPQと溶出位置が近く，特に$C_{40}$側鎖の還元型ユビキノンとプラストキノン還元型の分離は，一般的なODSカラムでは分離が十分に行えない．しかし，適切な検出器・検出条件を設定することで還元型ユビキノンを検出せずに定量誤差を抑えることができる．プラストキノン定量は，標品の酸化型，還元型のピークエリアとの比較により行う．

（例）キノン分離の条件

カラム：Luna 5$\mu$ C18 (2)
（$\phi$ 4.6 x 150 mm，Phenomenex, Inc.）[注11]
溶離液：メタノール/エタノール＝1/1(v/v)
カラム温度：40°C
流速　：1.0 ml/min
リテンションタイム：
還元型　7.4 min，酸化型　10.9 min

### [検出][注12]

検出法により，プラストキノンの定量限界，検出限界が異なるので，実験に適した検出器を選択する（表2）．

【吸光度検出】

ホトダイオードアレイ型（PDA）のような多波長で同時に検出可能なマルチ波長検出器を用いた場合，プラストキノンの酸化型255 nm，還元型290 nmの各吸収極大での検出波長により，同時に測定が可能である．しかし，還元型は酸化型に比べて吸光係数が小さい（酸化型の20％程度[4]）ために，還元型が低濃度のときは，UV吸収では定量性のある測定ができない．また，還元型は，比較的，早くに溶出することから色素類のピークの端に掛かりやすく，酸化型に比べて定量限界が比較的高くなる．一方，酸化型は比較的遅くに溶出され，他の物質と分離しやすく，明確なピークとして検出できることから，低濃度の還元型測定のために還元型を酸化型に変換後，HPLC測定を行う．まず，255 nmのUV検出によるHPLC分析により酸化型を定量し，その後，抽出溶液に最終濃度が0.5 mMになるように$FeCl_3$を添加し，全ての還元型プラストキノンを酸化型に反応させた後に再度，HPLCにより全PQ（PQ＋PQH）量の測定を行い，全PQから先程のPQ量を差し引くことでPQHを求める．しかし，HPLCカラムに高濃度のFeを含む溶液を直接インジェクションしても分析可能であるが，分析カラムの寿命を低下させてしまう可能性が高い．液-液分配操作などによりFeを取り除いた後（3 e.3.1）に分析を行うことでこれらの問題を解決できるが，多数の試料を同時に前処理には時間がかかり煩雑となる．このために，検出器の種類を適切なものを選択する．

【蛍光検出】[注13]

還元型は励起波長290 nmにおいて330 nmの蛍光を

[注10] 逆相カラム（ODSなど）に溶離液としてメタノールを中心にエタノールまたはヘキサンを混合することで酸化型，還元型を分離可能である．

[注11] ODSであれば，メーカにはこだわらない．また，本章では150 mm長のカラムを用いているが250 mm長でも，全く問題はない．

[注12] 定性限界とは目的物質が含まれていることを示すピークを認識できる限界値でS/N＝3程度である．定量限界とは目的物質の定量性が得られる下限値でありおよそS/N＝10である．

[注13] 本条件では還元型ユビキノン-9と還元型PQA-9の分離が不

表 2：プラストキノンの分離・検出条件

| カラム | 溶離液* | 流速 (ml/分) | 検出条件 【種類】 (波長，電圧) | キノン** | リテンションタイム (分) | 文献 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Teknokroma C18 (4.0 x 250 mm) | MeOH/Hex＝17/1(v/v) | 1.5 | 【蛍光，吸収】 ex.290 nm，em.330 nm abs 255 nm | PQA(red)<br>PQA(ox) | 8.8<br>26.2 | 22) |
| Radial-PAK Cartrige C-18 | MeOH/EtOH＝3/1(v/v) containing 50 mM $NaClO_4$, 2 mM $HClO_4$ | 2.0 | 【ECD(ref. Ag/AgCl)】 −250 mV(ox) | $PQC_{1-4}$(ox)<br>$PQC_{5,6}$(ox)<br>PQB(ox)<br>PQA(ox) | 6.9<br>8.0<br>10.9<br>15.2 | 12) |
| Radial-PAK Cartrige C-18 | MeOH/EtOH＝1/4(v/v) containing 50 mM $NaClO_4$ | 2.0 | 【ECD(ref. Ag/AgCl)】 −500 mV(ox) −800 mV(red) | PQA(red)<br>PQA(ox) | 3.4<br>8.2 | 25) |
| Shimpack ODS (4.6 x 250 mm) | MeOH/EtOH＝1/1(v/v) | 1.5 | 【蛍光($NaBH_4$ 還元)】 ex.290 nm，em.330 nm | PQA(red)<br>PQA(ox) | 7.8<br>21.5 | |
| Luna C18 (2) (4.6 x 150 mm) | MeOH/EtOH＝1/1(v/v) | 1.0 | 【蛍光(白金黒還元)】 ex.290 nm，em.330 nm | PQA(red)<br>PQA(ox) | 7.4<br>10.9 | |

* ：MeOH；メタノール，EtOH；エタノール，Hex；ヘキサン
** ：酸化型プラストキノン PQ(ox)，還元プラストキノン PQ(red)

示すことから，カラムによるキノン分離後に蛍光検出器により還元型プラストキノンの高感度測定が可能となる．しかし，酸化型プラストキノンは蛍光性を示さないことから，そのままでは還元型のみしか検出できない(図 5 A，B)．このことから，HPLC によりキノン類を分離した後，酸化型を還元型に反応させる post-reduction の操作を行うことで，蛍光検出器によるプラストキノン類の高感度検出が可能となる．定量限界は 2.0 pmol 以下であり，抽出溶液量に依存するが葉片として 1〜5 mg あれば十分測定可能である．キノン測定に関する post-reduction 法は，化学的還元，電気化的還元，触媒還元の 3 種類あるが，電気化学的な還元には特殊な装置が必要となることから，化学的還元，触媒還元の 2 種類を紹介する（図 4 A，B)．

【蛍光検出（$NaBH_4$ による化学的還元法)】

ODS カラムによりキノン類を分離した後に無蛍光性の酸化型キノンを反応コイル中で $NaBH_4$ と反応させることにより，蛍光性の還元型キノン（キノール）に還元し，蛍光検出器を用いて測定を行う (図 4 A)．分離カラムとして上記条件でキノンを分離後，カラム出口に接続した 40°C に保った反応コイル（$\phi$ 0.5 mm x 150 cm）の一端から還元試薬として 0.045%(w/v) $NaBH_4$ を含むエタノール溶液を流速 0.5 ml/min で流し，分離したキノン類の還元[注14] を行う．検出には蛍光検出器を用い，還元型プラストキノンを励起波長 290 nm，蛍光波長 330 nm の条件により検出する．全てのキノン類の定量を濃度既知のプラストキノンのピークエリアとの比較により行う．

【蛍光検出（白金黒カラムによる触媒還元法)】[注15]

ODS カラムによりキノン類を分離した後に無蛍光性の酸化型キノンを白金黒カラムで還元し，蛍光検出器を用いて測定を行う（図 3 B)．分離カラムの後ろに白金黒

完全であるが，エタノール溶液中では還元型プラストキノンの蛍光量子収率（0.117）は，還元型ユビキノン（0.004）に比べて大きく[20]，また，蛍光波長はそれぞれ 327 nm，371 nm と大きく異なっていることから，蛍光検出において還元型ユビキノンによる還元型プラストキノンの定量性に与える影響はほとんどない．

[注14] 反応コイル（$\phi$ 0.5 mm x 150 cm）を用いたキノンからキノールへの反応時間は同条件下で約 10 sec.であり，還元溶液 0.01% $NaBH_4$ で 1.0 nmol PQ が全還元される．高濃度の $NaBH_4$ はキノン類の分解を促進することが知られていることから，0.06% $NaBH_4$ でキノン類の分解を調べたが，各キノンの分解は確認されず，各測定間の誤差は 0.44%であった．還元試薬の 0.045%(w/v) $NaBH_4$ で 5.0〜2000 pmol/injection の広い濃度範囲においてピークエリアとキノン量とに相関関係が得られている．

[注15] 還元カラムは資生堂より 4.0x15mm，4.0x30mm の 2 種類が販売されている．しかし，乾燥状態でステンレスの空カラムに詰めて十分に使用できる品質のカラムを簡単に自作することができる．1.0 g の白金黒(platinum black)で 4.0 x 15 mm のカラムを詰めることができる．

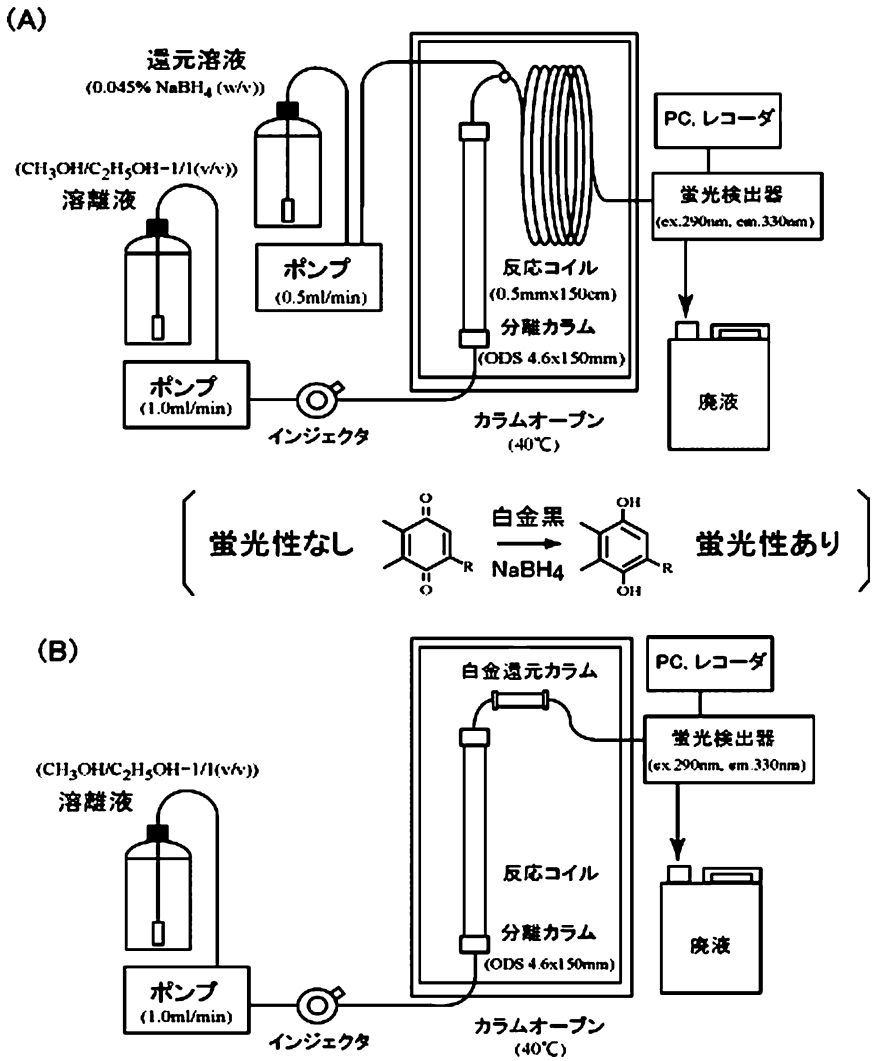



図4：ポストカラム還元法によるプラストキノンの高感度 HPLC 測定装置

カラムを接続するのみであることから，化学的還元法に比べて装置的にも簡略することができ，還元溶液の調整などの必要もない．

先程と同様な条件において分離・還元反応を行い，290 nm により励起した 330 nm のキノン類の蛍光を測定することにより検出する（図5 A，B）．全てのキノン類の定量を標準サンプルのピークエリアとの比較から行う．白金黒カラムの還元力は徐々に低下していくことから，カラムの長期保存，多数の検体を扱う場合は標品の PQ などを用いてチェックを行うべきである．

【酸化還元・電気化学検出】[注16]

ECD（電気化学検出器，electrochemical detector）は，電気化学的な反応を用いた検出器であり，アミン類の検出に良く用いられている．キノン類などの酸化還元反応を行う物質に対して検出の特異性が高い．原理として，カラムから分離したキノン類が検出器のセル内で電気的に還元（$Q+2e^-+2H^+ \rightarrow QH_2$）または酸化（$QH_2 \rightarrow Q+2e^-+2H^+$）し，その時の電流の大きさとキノン濃度が比例する．このとから，キノンの検出に用いることができる．

ECD 検出器を用いた HPLC は他の測定と異なり，溶離液に $NaClO_4$，$HClO_4$ など分子の大きな酸（過塩素酸）を添加する．実際の測定では，酸化型プラストキノン検出にポテンシャル -800 mV[25] または -250 mV[12] にセットする（表2）．酸化還元物質に対して高感度で特異的に応答することや各物質の酸化還元ポテンシャルが異なることから，ECD により高感度キノン分析を行うことができる．

[注16] ポテンシャル 0.25 V の条件では，トコフェロールキノン，ユビキノンフィロキノンも同時に検出される．

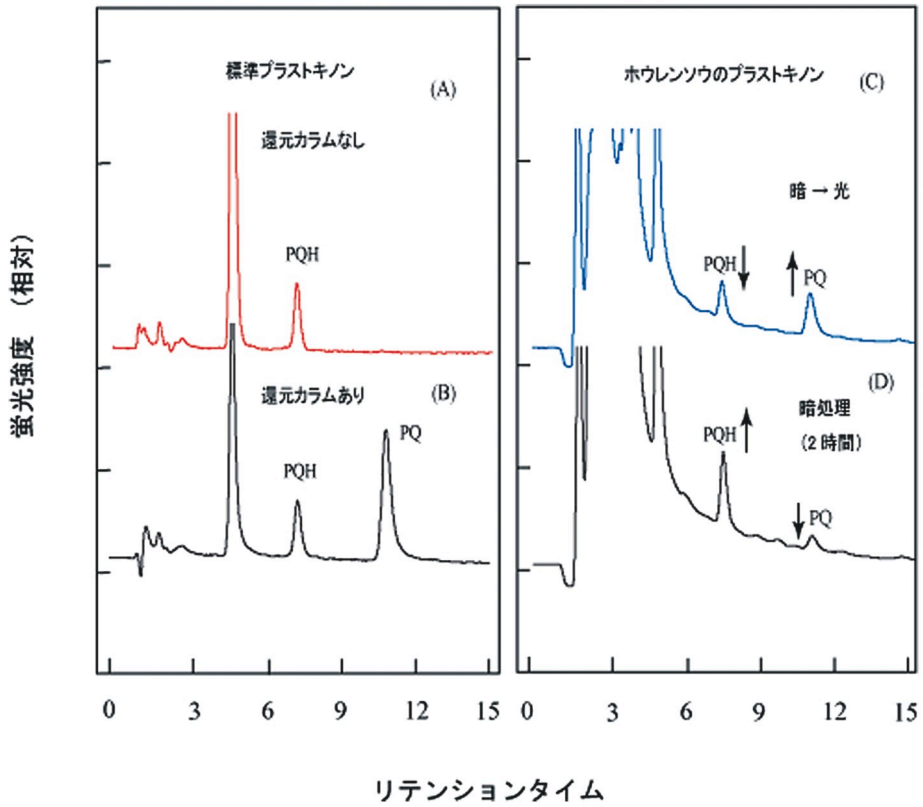



図5：酸化型，還元型プラストキノンの HPLC チャート

【より簡単な良感度な検出】[注17]

比較的低濃度の還元型を正確に定量するには，感度的に吸光度検出器では難しい．このことから，分離カラム以降に吸光度検出器（255 nm 設定）を接続することで酸化型を検出し，その後ろに蛍光検出器（ex 290 nm，em 330 nm に設定）を接続して還元型を検出することで酸化型・還元型を同時に比較的高感度で測定を行うことができる[22]．

## 3.e.4　おわりに

HPLC 測定に慣れていない場合や初めてプラストキノン測定を行う場合は，PDA 検出器のみ，または，PDA と蛍光検出器を備えた HPLC による測定を行うことで，比較的定量性のある結果が得られる（3 e.3.4 の【より簡単な良感度な検出】を参照）．また，試料数が多い場合やシロイヌナズナなどの薄い葉の場合，ビーズ破砕により抽出を行っても良い．さらに，HPLC 分析に HTP 型（high-through put）のカラムを用いることで分析時間を大幅に短縮でき，1 試料の HPLC 分析は 1 ～ 5 分以内にすることも可能である．

参考のために表 2 にプラストキノンの具体的な分析条件を示す．また，微量試料や高感度測定では，検出器の選択が重要となることから酸化型，還元型に対する感度の一覧を表 3 に記す．

測定以外に注意する点．プラストキノンはチラコイド膜以外に，包膜やプラストグロビュールに光合成電子伝達に関与しないプラストキノンが大量に存在している．このために，葉片のプラストキノンは電子伝達に関与するキノンと関与しないキノンが混在しており，葉片のキノン量（酸化還元状態）[22]，分析定量値のままでは光合成（電子伝達鎖）のプラストキノンプール（またはその酸化還元比）とはならないので注意が必要である[31]．実際，暗処理した葉のプラストキノンの 30%が還元型で，飽和光下でも全プラストキノンの 65%までしか還元されておらず，光強度に依存しないプラストキノンが存在していることが知られている（図 5 C，D）．

[注17] カラム出口以降の検出器の接続は，セルの耐圧性等の問題からの吸光度検出器の後ろに蛍光検出器を接続する．

## 文献

1）J. F. Allen & T. Pfannschmidt, Phyilos. Trans. R. Soc.,

**表3**：プラストキノン類の検出感度の比較

| 検出の種類 | 検出器（条件） | 検出感度 | |
|---|---|---|---|
| | | 酸化型 | 還元型 |
| | 紫外吸収検出器 | | |
| 吸収 | 255 nm | 中 | − |
| | 290 nm | 低 | 低 |
| | 蛍光検出器（ex.290 nm，em.330 nm） | | |
| 蛍光 | ノーマル | − | 高 |
| | 白金黒カラム還元 | 高 | 高 |
| | $NaBH_4$ 還元 | 中高 | 中高 |
| 酸化還元電位 | 電気化学検出器 | | |
| | −800 mV | 高 | − |
| | 500 mV | − | 高 |


B**355** (2000) P.1351.

2）H. Zer & I. Ohad, Trends Biochem. Sci., **28** (2003) P. 467.

3）C. H. Foyer & G. D. Noctor, Antioxid Redox Signal, (2008)

4）R. Barr & F. L. Crane F. L.; Methods in Enzymology (ed. San Pietro, A.) volXXIII, Academic Press, 1971, p. 372.

5）岡山茂樹，「光合成研究法」，共立出版，1981，p.321．

6）H. K. Lichtenthaler, Photosynth. Res., **l92** (2007) P.163.

7）H. H. Grumbach, Z. Naturforsch., **38**c (1983) P.996.

8）R. Kana, E. Kotabová & O. Prásil, Physiol. Plant, **133** (2008) P.794.

9）H. K. Lichtenthaler, Photosynth. Res., **92** (2007) P.163.

10）H. K. Lichtenthaler, U. Prenzel, D. Douce & J. Joyard, Biochim. Biophys. Acta, **641** (1981) P.99.

11）P. Joliot & A. Joliot, Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, **99** (2002) P.23.

12）S. Okayama, Plant Cell Physiol., **25** (1984) P.1445.

13）H. Eck & A. Trebst, Z. Naturforsch., **18**B (1963) P.446.

14）J. Soll, M. Kemmerling & G. Schults, Arch. Biochem. Biophys., **204** (1980) P.544.

15）J. Soll, G. Schultz, J. Joyard, R. Douce & M. A. Block, **238** (1985) P.290.

16）K. G.. Hutson & D. R. Threlfall, Biochim. Biophys. Acta, **632** (1980) P.630.

17）Z. Cheng, S. Sattler, H. Maeda, Y. Sakuragi, D. A. Bryant & D. D. Penna, Plant Cell, **15** (2003) P.2343.

18）M. Wanke, K. Skorupinska-Tudek & E. Siezewas, Acta Biochemi. Poloica, **45** (2001) P.663.

19）H. K. Lichtenthaler, Fett. Lipid, **l00** (1998) P.128.

20）C. DeVitry, C. Carles & B. A. Diner, FEBS Lett., **196** (1986) P.203.

21）J. Kruk & K. Strzalka, J. Photochem. Phtobiolo., B.: Bio, **33** (1993) P.33.

22）J. Kruk & S. Karpinski, Biochem. Biophys. Acta, **1757** (2006) P.1669.

23）K. Kusube, K. Abe, O. Hiroshima, Y. Ishiguro, S. Ishikawa & H. Hoshida, Chem. Pharm. Bull., **32** (1984) P.179.

24）H. Shimada, R. Ohno, M. Shibata, I. Ikegami, K. Onai, M. A. Ohto & K. Takamiya, Plant J., **41** (2005) P.627.

25）M. Isogai, M. Nishimura & S. Okayama, Plant Cell Physiol., **28** (1987) P.1301.

26）H. Hiraike, M. Kimura & Y. Itokawa, Y., J. Chromatog., **430** (1988) P.143.

27）H. Hiraike, M. Kimura & Y. Itokawa, Y., Am. J. Obstet. Gynecol., **158** (1988) P.564.

28）H. Hiraike, M. Kimura & Y. Itokawa, Y., Jpn. J. Hyg., **41** (1986) P.764.

29）M. Shibata, M. Tsuyama, T. Takami, H. Shimizu & Y. Kobayashi., J Exp Bot., **55** (2004) P.1989.

30）J. Kruk, K. Strzalka, R. M. Leblanc, Biochem. Biophys. Acta, **1112** (1992) P.19.

31）J. Kruk & Karpinski; Photosynthesis: Fundamental Aspectsto Global Perspectives (eds A. van der Est, D. Bruce), Int. Soc. Photostnth., 2005, P.568.

# 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[1)]

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[1),2)]

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 $b_6f$ 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[3)]．$Fe^{3+}$ や $Cu^{2+}$ 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．

1）大阪大学大学院理学研究科生物科学専攻

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-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（$F_A$/$F_B$）タンパク質質の調製

PsaCタンパク質質は光化学系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質として存在する．複合体の立体構造からも明らかなように，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[4)]

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撹拌する．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

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[5]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[6]

[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 $MgCl_2$ 溶液

[手順]

ホウレンソウの葉（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分間ゆるやかに撹拌した後，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 $MgCl_2$ 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$MgCl_2$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% $\beta$-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時間ゆるやかに撹拌する．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[7]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[8]．従来の$o$-フェナントロリン法については他の文献[9]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 $\mu$l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 $\mu$l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 $\mu$l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（$Fe(NH_4)(SO_4)\cdot 6H_2O$）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, Biochimi. 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, Biochimi. 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.

# 3．酵素・電子伝達成分の精製・活性測定・定量
## g．$CF_oCF_1$，光リン酸化

紺野　宏記[1)]，久堀　　徹[1)]

葉緑体 ATP 合成酵素（$CF_oCF_1$）は，光合成に必要な ATP を合成する酵素で，ミトコンドリアや細菌の ATP 合成酵素と同じく，プロトンの電気化学的勾配を利用している．その特徴は，他の ATP 合成酵素とは異なり，酸化還元調節を受ける点にある．本章では $CF_oCF_1$ の取り扱い，酸化還元調節の生化学的研究法，チラコイド膜や大腸菌反転膜を利用した ATP 合成活性の測定法等を紹介する．

## Chloroplast ATP synthase ($CF_oCF_1$) and its activity

Hiroki Konno, Toru Hisabori

$F_oF_1$-ATP synthase catalyzes ATP synthesis driven by the electrochemical potential of proton gradient across the energy transducing membranes formed by photosynthetic or respiratory electron transfer reaction. The chloroplast ATP synthase, $CF_oCF_1$ is unique due to its thiol modulation property. In this chapter, the basic method for the preparation of $CF_oCF_1$ from spinach leaves, the methods for the measurement of ATP hydrolysis activity, proton transfer activity and photophosphorylation activity are described.

### 3.g.1　葉緑体 ATP 合成酵素の特徴

葉緑体 ATP 合成酵素（$CF_oCF_1$）は，光合成の電子伝達系によって水が分解され還元力である NADPH が生成される過程でチラコイド膜の内外に形成されるプロトンの電気化学的勾配（$\Delta\mu H^+$）を駆動力として ATP 合成を行っている．すなわち，この酵素は光エネルギーを化学エネルギーに変換する鍵酵素である．同様の酵素は，ミトコンドリア内膜や細菌細胞膜に存在する呼吸鎖でも働いており，これらは呼吸基質（多くの場合，糖）の分解によって生成する NADH から酸素までの電子伝達反応によってエネルギー産生膜系で形成される $\Delta\mu H^+$ を利用して ATP を合成する（酸化的リン酸化）．触媒活性を担う $F_oF_1$ の基本構造は，すべての生物種由来のものにおいて維持されており，ATP 合成および加水分解の分子機構も基本的に同じである．しかし，$CF_oCF_1$ だけは，光合成反応によって形成される $\Delta\mu H^+$ を駆動力としているため（光リン酸化），駆動力を供給できない夜間には ATP 合成の逆反応である ATP 加水分解反応が起こり，エネルギー的に不利な状況に陥る危険がある．このような環境条件に対応するため，$CF_oCF_1$ には光合成の電子伝達系が駆動しない暗条件下で酵素活性を抑制するための様々な活性調節機構が存在し，これが上記のような逆反応を抑えていると考えられている．そのひとつは，$\Delta\mu H^+$ による調節（$\Delta\mu H^+$ activation）である．$CF_oCF_1$ は暗所下で不活性な状態にあり，光照射により一定量の $\Delta\mu H^+$ が形成されると活性化する．この $\Delta\mu H^+$ activation に伴って，$\gamma$ と $\varepsilon$ サブユニットが構造変化することが知られている[1,2)]．すなわち，$\gamma$ と $\varepsilon$ サブユニット間の相互作用により暗所では溶液中に露出していないそれぞれのサブユニット上の Lys 残基が，$\Delta\mu H^+$ によって誘導される構造変化により溶液中に露出して，Lys の修飾試薬であるピリドキサールリン酸によって修飾されるという実験結果がある．しかし，この実験ではタンパク質分子において具体的にどのような構造変化が誘導されるかが明らかになっていないので，$\Delta\mu H^+$ activation の分子機構そのものは現在でも不明のままである．$CF_oCF_1$ に $\Delta\mu H^+$ activation による構造変化を誘導しなければ，葉緑体から調製したチラコイド膜に ATP を加えても ATP 加水分解活性や $H^+$ 輸送活性はまったくみられないので[3,4)]，この現象が酵素活性の調節機構のひとつと考えることが出来る．もうひとつの調節機構は，チオール調節とよばれている．葉緑体 ATP 合成酵素の $\gamma$ サブユニットには他の生物種由来の ATP 合成酵素にはみられない 37 アミノ酸長の挿入配列があり，この挿入配列上のふたつの Cys 残基間によるジスルフィド結合の形成・解離により酵素活性が調節されている[5–7)]（図 1）．そこで，この挿入配列を，調節領域とよぶ．$\gamma$ サブユニットの分子内に形成されるこのジスルフィド結合の還元は，光照射により光合成電子伝達系が働きフェレドキシンが還元さ

1）東京工業大学資源化学研究所

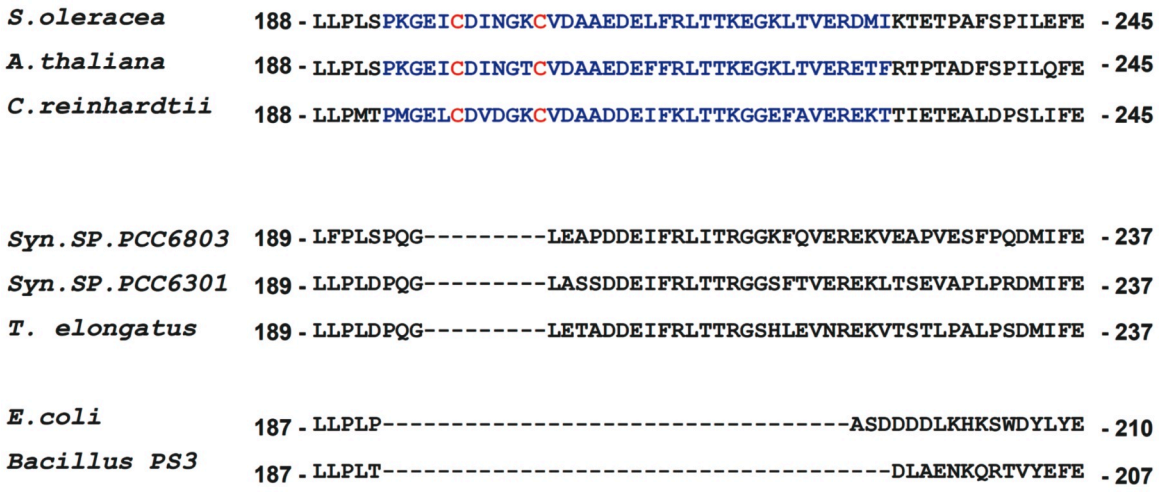



図 1：葉緑体 ATP 合成酵素 γ サブユニット上にみられる調節領域
青：調節領域　赤：チオール調節を行うシステイン残基

れた際，その一部の電子を用いて還元されるチオレドキシン（Trx）によって行われる．$CF_oCF_1$ の酵素活性（ATP 加水分解活性）は，この還元によって 2 ～ 3 倍上昇する[8]．チオール調節および $\Delta\mu H^+$ activation はそれぞれ単独で働くものではなく，互いに関わりあいを持ちながら活性を調節する機構と考えられる．すなわち，上述のピリドキサールリン酸による Lys 残基の標識実験の結果に従えば，$\Delta\mu H^+$ の形成によって γ と ε サブユニットが構造変化することで γ サブユニット上の調節領域が表面に露出する．次に，フェレドキシンにより還元されたチオレドキシンが，γ サブユニット上に露出した調節領域のジスルフィド結合を還元する．このように，$\Delta\mu H^+$ activation は Trx によるジスルフィド結合の還元を起こすために必要と考えられている．また，調節領域のジスルフィド結合が還元されると，より低い $\Delta\mu H^+$ でも ATP 合成が可能となることも知られている[9]．

もうひとつの調節機構は，内在性の阻害サブユニットとして知られている ε サブユニットが担っている．ε サブユニットの ATP 加水分解活性に対する阻害効果は細菌由来の ATP 合成酵素においてもみられるが，$CF_1$ 由来の ε サブユニットはその阻害効果が顕著で，これも暗所下で ATP の加水分解を効率よく抑制する機構のひとつと考えられている．しかし，このような $CF_oCF_1$ の活性調節機構の詳細は，$CF_oCF_1$ の取り扱いの制約および結晶構造がまだ完全に明らかにされていないことなどの理由から，いまだに不明な点が多い．特に，$CF_oCF_1$ もその可溶性画分である $CF_1$ も，シロイヌナズナの全ゲノムが解読され遺伝子構成が全て明らかになった現在でも，いまだに活性をもった組み換え体タンパク質を得ることが出来ないため，分子レベルでの研究が細菌由来の ATP 合成酵素の研究に比べて立ち後れている．筆者らは，次善の策として好熱菌 *Bacillus* PS3（$TF_oTF_1$）由来の α，β サブユニットと葉緑体由来の γ サブユニットを再構成させたキメラ $\alpha_3\beta_3\gamma$ 複合体を用いた研究をおこなった[10–12]．本章の前半では，ホウレンソウからの $CF_1$（$\alpha_3\beta_3\gamma\delta\varepsilon$），$\alpha_3\beta_3\gamma$，$\alpha_3\beta_3$ の調製法や ATP 加水分解活性の測定法などを紹介する．また，ホウレンソウより調製した葉緑体由来の $\alpha_3\beta_3$ と組み換え体 γ を再構成させ，γ サブユニットへの変異導入がチオール調節に与える影響を調べた一連の研究において用いた方法およびそれによって得られた結果を紹介する．葉緑体 ATP 合成酵素のような酸化・還元応答する酵素では，タンパク質の酸化還元状態と酵素活性の変化の対応付けが重要である．そこで，SH 基の修飾試薬である 4-acetamido-4'-maleimidyl-stilbene-2, 2'-disulfonate（AMS）を用いて，γ サブユニットの還元状態を SDS-ゲル電気泳動の移動度の変化によって確認する方法もあわせて紹介する．後半では，葉緑体チラコイド膜を用いた ATP 合成活性の測定および大腸菌反転膜小胞を用いた ATP 合成酵素のプロトンポンプ活性の測定法について述べる．

## 3.g.2　$CF_1$ の調製と ATP 加水分解活性の測定

ATP 合成酵素は光リン酸化反応や酸化的リン酸化反応を行う酵素として 1950 年代に発見され，当初からアメリカの E. Racker の研究室を中心に活発に研究が行われた[13–15]．従って，その精製方法は早くから確立されており，現在でも基本的には同じ方法が用いられている．$CF_1$ は分子を構成する基本サブユニットが，α，β，γ，

$\delta$, $\varepsilon$ の5種類からなる複雑な分子複合体であり，可溶性画分として膜から抽出した場合，ATP 合成活性を失っているが，様々な条件下で ATP 加水分解活性を測定することが出来る．ここでは，もっとも簡便に $CF_1$ を得ることの出来るふたつの方法を紹介する．

### 3.g.2.1 $CF_1$ の調製法（クロロホルム抽出法）

ATP 合成酵素の $F_1$ 部分の抽出方法として一般的に用いられるのが，クロロホルム抽出法である[16]．これは，疎水的な膜タンパク質成分を脂質膜とともにクロロホルム層に集めて親水性タンパク質成分のみを回収する方法である．含ハロゲン有機溶媒の取り扱いと処理が若干面倒であるが，高純度の $CF_1$ を大量・簡便に抽出することが可能である．

[実験方法]

1．葉緑体破砕液（300 mM sucrose，20 mM Tris-Cl (pH 8.0)，10 mM NaCl）をあらかじめ調製し，氷冷しておく．
2．市販されているホウレンソウの葉（中ろくを除いたもの）100 g に対して 200 ml の葉緑体破砕液を加え，調理用ミキサーを用いて破砕する（ブレンダーミキサーを用いても構わないが，いずれの場合も葉の断片がいくらか見える程度で破砕操作をやめる）．筆者らは，通常，一回の抽出操作について 1〜1.5 kg のホウレンソウ緑葉を使用している．
3．破砕した葉を 4 層のガーゼでろ過し，ろ液を遠心 (5,000×g，10 分間) する．遠心操作は，4 ℃で行う．
4．遠心後の沈殿を 2 mM Tricine-KOH (pH 8.0)，10 mM NaCl に懸濁して，4 ℃で 60 分間スターラーを用いて撹拌する．沈殿の懸濁には，絵の具用の絵筆を用いるとよい．この低張操作によって葉緑体の包膜を破壊し，チラコイド膜標品を得る．
5．この懸濁液を，15,000×g で 10 分間遠心し，得られる沈殿を 10 mM Na-pyrophosophate (pH 7.4) に懸濁し，4 ℃で 10 分ほどインキュベートしてから遠心処理して沈殿を得る．この操作を二度繰り返して，チラコイド膜表面に結合している Rubisco を除去する．
6．2 度目の遠心後の沈殿を，あらかじめ室温に保温しておいた 500 mM sucrose，40 mM Tricine-KOH (pH 8.0)，2 mM EDTA[注1]，4 mM ATP，10 mM DTT で，2.5〜3 mg chlorophyll/ml になるように懸濁する．
7．この溶液に 1/2 容量のクロロホルムを加え 15 秒間激しく撹拌する．撹拌後，4,000×g で 5 分間遠心して，手早く黄緑色の上清をクロロホルム層から分離して回収する．この上清を 70,000×g で 30 分間 (20°C) 遠心する．得られた上清に 70%飽和となるように硫安を加えて 4 ℃で保存する．

以上の操作によって，SDS-PAGE の結果（図 2-A，レーン 1）に示すように，ほぼ夾雑物のない $CF_1$（$\alpha_3\beta_3\gamma\delta\varepsilon$）を得ることが出来る．必要に応じて，ゲル濾過法などによりさらに精製する．

### 3.g.2.2 ショ糖を用いた精製法（スモールスケール）

$CF_1$ は，葉緑体チラコイド膜の表在性タンパク質としてかなりの部分を占めているが，$CF_o$ との結合は分子間相互作用によるもので，それほど強固ではない．このため，溶液の組成を適当に変化させるだけでも簡単にチラコイド膜から遊離させ，回収することができる[17]．

[実験方法]

1．ホウレンソウの緑葉 10 g に，チラコイド膜抽出液 (0.3 M Sucrose，1 mM $MgCl_2$，50 mM NaCl，20 mM Tricine-NaOH (pH 8.0)) を 20 ml 加え，ミキサーで軽く破砕する．残渣をガーゼで除き，濾液を 3000 rpm で 10 分間遠心して沈殿を得る．
2．沈殿にチラコイド膜抽出液 10 ml を加えてパスツールピペットを用いてよく懸濁し，10,000×g で 2 分間遠心する．
3．上清を除き，沈殿に 10 mM Na-pyrophosphate (pH 7.5) を 10 ml 加えてパスツールピペットで懸濁した後，10,000×g で 2 分間遠心する．この操作を 3 回繰り返す．
4．得られた沈殿に 0.3 M sucrose，10 mM Tricine-NaOH (pH 8.0) を 2.5 ml 加え，十分に懸濁してから室温で 30 分間放置する．
5．この溶液を 20,000×g で 30 分間遠心して上清を回収するだけで，ほぼ夾雑物を含まない $CF_1$ 標品が得られる．

### 3.g.2.3 $\alpha_3\beta_3\gamma$ の精製[18]

3.g.2.1 で紹介した方法で抽出した $CF_1$ は，基本的には $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\varepsilon$ のサブユニット構成であるが，$\delta$ サブユニットは部分的に外れていることや，$\varepsilon$ サブユニットが ATP 加水分解活性を強力に阻害していることなど，酵素の均一性にはやや難点がある[注2]．そこで，触媒活性を維持した

[注1] $CF_1$ と $CF_o$ の結合には $Mg^{2+}$ イオンが重要な役割を果たしている．このため，EDTA のようなキレート剤を加えると，両者は解離しやすくなる．クロロホルムで膜を変性させなくても，EDTA の添加によって $CF_1$ は $CF_o$ から外すことが出来るので，この方法だけで温和に精製する方法もあるが，収率が低くなる．

[注2] 得られる標品の電気泳動の染色バンドの濃度から判断する限

最小単位である $\alpha_3\beta_3\gamma$ の調製方法が確立されている．

[実験方法]

1．ホウレンソウより調製した $CF_1$（10〜30 mg，硫安沈殿として保存した場合には脱塩操作をあらかじめ行い，25 mM Tris-Cl(pH 8.0) 溶液とする）を，25 mM Tris-Cl(pH 8.0)，2 mM ATP，5 mM DTT であらかじめ平衡化した DEAE-Sephacel（GE ヘルスケア）カラム（1×10 cm）にロードし，$CF_1$ をカラムに吸着させる．

2．20 ml の上記の緩衝液で吸着しないタンパク質を完全に溶出させた後，50〜100 ml の 25 mM Tris-Cl (pH 8.0)，2 mM ATP，5 mM DTT，30%(v/v)glycerol，20%(v/v)ethanol，0.1 M NaCl を付加し，$\varepsilon$ サブユニットを $\alpha_3\beta_3\gamma$ より解離させる．この操作で一部の $\delta$ も解離する．

3．20 ml の 25 mM Tris-Cl(pH 8.0)，2 mM ATP でカラムを洗浄し，glycerol や ethanol を除去した後，20〜50 ml の 25 mM Tris-Cl(pH 8.0)，2 mM ATP，0.4 M NaCl でカラム内に吸着している $\alpha_3\beta_3\gamma$ を溶出させる．$\alpha_3\beta_3\gamma$ を含む分画を 12% SDS-PAGE で確認し，その分画に 70%となるように硫安を加えて，使用時まで 4 ℃で保存する．この方法で調製した $\alpha_3\beta_3\gamma\delta$ 複合体の SDS-PAGE の実験例を図 2 A，レーン 2 に示す．この標品では，$\delta$ サブユニットがまだ完全に除去できていない．

### 3.g.2.4 $\alpha_3\beta_3$の精製[19)]

葉緑体由来の ATP 合成酵素では，$\alpha$ および $\beta$ サブユニットは，再構成可能な組み換え体タンパク質を得ることが出来ないが，$\gamma$ サブユニットだけは既に発現系が構築されており，変異導入実験も行われている．そこで，アメリカの Richter らは，葉緑体 ATP 合成酵素から $\alpha_3\beta_3$ 部分だけを調製する方法を確立し，これに組み換え体 $\gamma$ を再構成している[19,20)]．

[実験方法]

1．15〜20 mg の $\alpha_3\beta_3\gamma$ に ATP/$MgCl_2$ を終濃度で 5.5 mM/5 mM となるように加える．この溶液をスターラーでゆっくりと撹拌しながら，室温で 10 M LiCl をゆっくりと加え，LiCl の終濃度を 2 M となるようにする（タンパク量は 1 mg/ml となるようにする）．

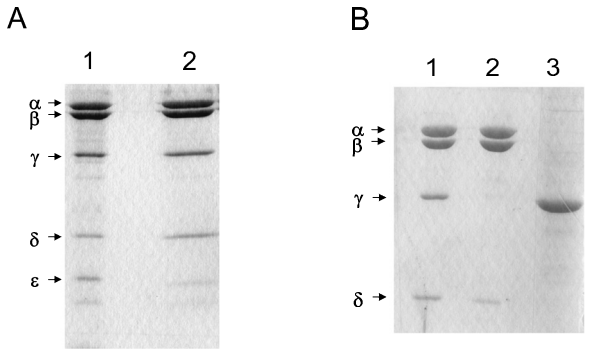



**図 2**：葉緑体 ATP 合成酵素の部分複合体の調製
Aレーン 1，ホウレンソウからクロロホルム抽出法により調製した $CF_1$（$\alpha_3\beta_3\gamma\delta\varepsilon$ 複合体）．
レーン 2，$CF_1$ から $\varepsilon$ を除去する処理をした後の $\alpha_3\beta_3\gamma\delta$ 複合体．
Bレーン 1，$\alpha_3\beta_3\gamma\delta$
レーン 2，$\alpha_3\beta_3\gamma\delta$ 複合体から調製した $\alpha_3\beta_3$ 複合体．
レーン 3，大腸菌内で不溶性画分として発現した $CF_1\gamma$ を調製したもの．

2．氷上で 1 時間，ゆっくりと撹拌を続ける．

3．酵素溶液を細孔径 0.2 $\mu$m のフィルターに通して微粒子を除去し，十分に冷却した 30 mM potassium phosphate(pH 7.0)，1 mM MgATP，0.3 M LiCl で平衡化した Hydroxyapatite（BioRad 130-0420）カラム（1.5×15 cm）にロードする（サンプルの容量はカラム体積の半分程度まで）．

4．30 mM potassium phosphate(pH 7.0)，1 mM MgATP，0.3 M LiCl 溶液 150 ml でカラムからタンパク質を溶出し，$\alpha$ サブユニットと $\beta$ サブユニットの両方を含む分画を 12% SDS-PAGE で確認した後，この分画を 20 mM HEPES-NaOH(pH 7.0)，10% glycerol，1 mM MgATP，2 mM DTT に対して，4 ℃で 15 時間透析する．

5．この段階で得られる標品には，$\gamma$ サブユニットを含む $\alpha_3\beta_3\gamma$ が共存している．そこで，20 mM HEPES-NaOH(pH 6.5)，1 mM MgATP，1 mM EDTA で平衡化した DEAE-cellulose（Sigma D 3764）カラム(2〜3 ml)に数 mg のタンパク質を含む上記画分（$\alpha_3\beta_3$ および $\alpha_3\beta_3\gamma$ が含まれている）をロードし，カラム体積の 3〜5 倍量の 120 mM NaCl，20 mM HEPES-NaOH(pH 6.5)，1 mM MgATP，1 mM EDTA を流して，解離している $\beta$ サブユニットを溶出させる．次に，3〜5 倍量の 170 mM NaCl，20 mM HEPES-NaOH(pH 6.5)，1 mM MgATP，1 mM EDTA で $\alpha_3\beta_3$ を溶出させる．さらに，400 mM NaCl，20 mM HEPES-NaOH(pH 6.5)，1 mM MgATP，1 mM EDTA で $\alpha_3\beta_3\gamma$ を溶出する．

り，3.g.2.2 の方法で調製した標品のサブユニット数量比の方が，$CF_1$ 本来のそれに近いと思われる．

6．得られた $\alpha_3\beta_3$ 及び $\alpha_3\beta_3\gamma$ はそれぞれ 20 mM HEPES-NaOH（pH 7.0），20% glycerol，1 mM MgATP に対して 4 ℃で 15 時間透析する．透析後のサンプルを濃縮し使用時まで－80℃で保存する．上記の方法で調製した $\alpha_3\beta_3\gamma$ 及び $\alpha_3\beta_3$ 複合体の SDS-PAGE の結果を図 2 B，レーン 1 およびレーン 2 に示す．これらの標品では，$\delta$ サブユニットがまだ完全に除去できていない．

### 3.g.2.5 葉緑体 $\alpha_3\beta_3$ とリコンビナント $\gamma$ の再構成[19,20]

$CF_1\gamma$ は大腸菌を用いた組み換え体タンパク質の大量発現系が既に構築されているので，アミノ酸変異を行った $\gamma$ サブユニットの作成は容易である．筆者らの $CF_1\gamma$ 変異体は，ドイツ Heinrich-Heine 大学の Strotmann 教授の研究グループから供与されたホウレンソウ $CF_1\gamma$ サブユニット単独発現系をもとに作成した．変異 $\gamma$ のプラスミドの作成及び大腸菌内での発現条件の詳細は文献を参照されたい[10−12]．

[実験方法]

1．組み換え体 $\gamma$（図 2 B，レーン 3）は大腸菌体内で封入体として発現してしまうので，50 mM $NaHCO_3$-NaOH（pH 9.5），1 mM EDTA，5 mM DTT，20% glycerol，4 M urea に溶解させる．この溶液を 50 mM $NaHCO_3$-NaOH（pH 9.5），0.3 M LiCl，1 mM EDTA，5 mM DTT，20% glycerol に対して 4 ℃で 24 時間透析する．透析後の試料をタンパク質濃度 1 mg/ml となるように濃縮し使用時まで－80℃で保存する．

2．精製した $\alpha_3\beta_3$ を 50 mM HEPES-NaOH（pH 7.0），20% glycerol，2 mM $MgCl_2$，2 mM ATP，2 mM DTT で 100 $\mu$g/ml となるように希釈し，氷上で $\gamma$ を含む上記の溶液をモル比で 3 $\gamma$：1 $\alpha_3\beta_3$ となるように $\alpha_3\beta_3$ 溶液に滴下する．$\alpha_3\beta_3$ 及び $\gamma$ を混合させた溶液を穏やかに撹拌し 20℃で 2 時間インキュベートする．

3．再構成した $\alpha_3\beta_3\gamma$ はゲルろ過 HPLC（Tosoh, SW-$G3000_{XL}$ カラム）によって分取する．

### 3.g.2.6 ATPase 活性の測定[21,22]

$CF_1$ の ATP 加水分解活性は，リンモリブデン酸比色定量法やマラカイトグリーンを用いた比色定量法によって遊離した Pi を定量することで高感度に測定することができる．本項では，ATP 再生系を用いた ATP 加水分解活性の測定法を紹介する．ATP 再生系を用いた測定法では，系の中の ATP 濃度を一定に保ち，酵素の ATP 加水分解活性を実時間で追うことができるので，速度論的な解析を行う際に非常に有用である．$CF_1$ などの場合には，酸化状態と還元状態で活性が大きく異なるので，タンパク質の酸化還元状態をそろえておくためにあらかじめ DTT 及びチオレドキシン（Trx-*f*）（還元型にするため）または $CuCl_2$（酸化型にするため）で，30℃，30 分間インキュベートしておく．

[実験方法]

1．37℃で保温した 930〜950 $\mu$l の反応溶液（50 mM Tricine-KOH（pH 8.0），2 mM ATP，2 mM $MgCl_2$，50 mM $Na_2SO_3$，50 mM KCl，5 mM phosphoenolpyruvate（PEP），50 $\mu$g/ml pyruvate kinase（PK），50 $\mu$g/ml lactate dehydrogenase（LDH），0.2 mM NADH）に，酸化・還元処理した酵素液（50〜70 $\mu$l）を加え反応を開始させる．

2．この反応系では，ATP 加水分解によって生じた ADP は PK によって速やかに ATP に戻り，その時に生じるピルビン酸が LDH によって乳酸に還元されるときに 1 分子の NADH が消費される．従って，ATP 加水分解活性は NADH の 340 nm における吸光度の減少から直接算出することが可能である．反応溶液 1 ml の場合次の計算式によって，比活性を算出する．

$$\text{比活性(U/mg)} = \Delta A_{340}/\text{min} \times 10^6/6220 \times \text{protein}(\mu g)$$

### 3.g.2.7 AMS による $\gamma$ の還元状態の確認[23,24]

$CF_1$ を初めとするチオール酵素は，酸化条件下では分子内ジスルフィド結合を形成し，それによって起こる構造変化が酵素活性を低くあるいは完全に抑えている．このタンパク質分子内でのジスルフィド結合を可視化する方法として，4-acetamido-4'-maleimidyl-stilbene-2, 2'-disulfonate（AMS）のような SH 修飾試薬を用いてタンパク質を標識し，標識に起因する分子量およびタンパク質の荷電状態の差を利用して，電気泳動的に酸化状態と還元状態のタンパク質を識別する方法がある．この方法を用いると，系の中に混在する酸化型と還元型の割合を決定することや，修飾可能な SH 基の数を推定することが可能である．ここでは，$CF_1\gamma$ の調節領域を含む $TF_1$ の $\alpha_3\beta_3\gamma$（$\alpha_3\beta_3\gamma_{TCT}$）複合体を用いて $\gamma$ の還元状態を確認した結果を紹介する[25]．

[実験方法]

1．前項と同様に，$CF_1\gamma$ の調節領域上のジスルフィド結合を還元するため，$CF_1$ あるいは $\alpha_3\beta_3\gamma_{TCT}$ 複合体を 100 $\mu$M DTT，5 $\mu$M Trx-*f*，50 mM HEPES/KOH（pH 7.5），5 mM $MgCl_2$ で 30℃，10 分間インキュベートする．酸化処理する場合には，DTT と Trx-*f* の代わりに，50 $\mu$M $CuCl_2$ を用いる．

2．酸化・還元処理した $\alpha_3\beta_3\gamma_{TCT}$ 複合体に同量の 10% TCA を加え，氷上で 10 分間インキュベートする．この溶液を 15,000×g で 10 分間遠心して沈殿を得る．沈殿に 200 μl の氷冷したアセトンを加えて懸濁した後，15,000×g で 5 分間遠心する．この操作を二度繰り返す．

3．遠心後の沈殿からアセトンを乾燥によって除去した後，10 μl の 1％ SDS，50 mM Tris-Cl（pH 7.5），15 mM AMS[注3] を加え室温で 30 分間強く撹拌して沈殿を完全に溶解する．この溶液に 10 μl の SDS-PAGE sample buffer（2-メルカプトエタノールを含まない溶液）を加え，9.0％ SDS-PAGE で酸化・還元処理による γ の移動度の違いを調べる．

この方法は，分子量が 4 万までの比較的小さなタンパク質の酸化還元状態を見るのに簡便で有効な方法である．図 3 には，γ 上のジスルフィド結合の還元の程度に比例して ATP 加水分解活性が上昇する様子を調べた結果を示す．

## 3.g.3 $CF_oCF_1$ を用いた光リン酸化活性の測定と大腸菌反転膜によるプロトンポンプ活性の測定

ホウレンソウ緑葉から単離した葉緑体を用いた光リン酸化活性の測定は，50 年以上前に Arnon によって報告されている．非循環的な電子伝達による光リン酸化活性を測定するためにはパーコール法などで無傷葉緑体を調製する必要があるが，循環的電子伝達による活性は，包膜を欠いたチラコイド膜標品でも容易に測定することが出来る．一方，$CF_oCF_1$ が ATP を加水分解すると同時に ATP 合成の時とは逆にチラコイド膜ルーメン側にプロトンを輸送するプロトンポンプ活性を測定するためには，適当な蛍光色素を用いる必要があり，クロロフィルを大量に含む葉緑体チラコイド膜では実測が難しい．本項では，ホウレンソウ葉緑体による光リン酸化活性の測定法，大腸菌反転膜小胞を用いたプロトンポンプ活性の測定法を紹介する．

### 3.g.3.1 ホウレンソウ葉緑体チラコイド膜の調製

基本的には，$CF_1$ を調製するときと同じ方法でいわゆるチラコイド膜標品を得るが，光リン酸化活性を測定する場合には，使用する緩衝液条件をより穏和なものにする．理由はよく分からないが，緩衝液には，Tris よりも Tricine を用いた方が高い比活性が得られる．

[注3] AMS は使用時に調製する．

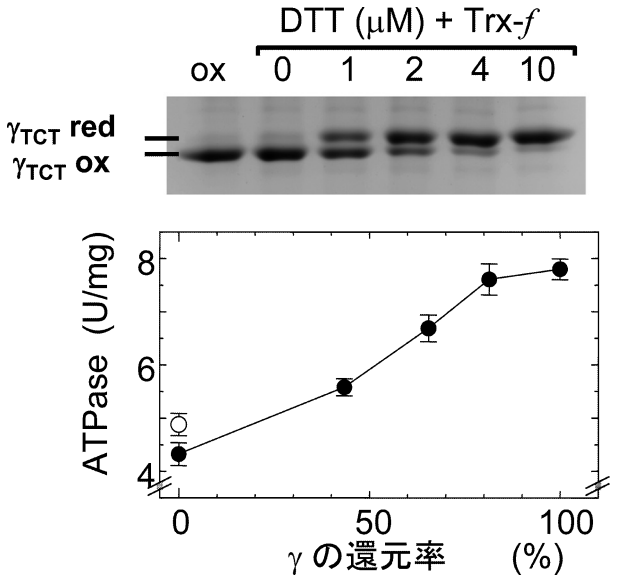



図 3：AMS による γ の還元と酵素の活性化
A　調節領域を含む $\alpha_3\beta_3\gamma$ 複合体（$\alpha_3\beta_3\gamma_{TCT}$）の γ サブユニット部分の酸化還元レベルを DTT および Trx-*f* によって変化させ，AMS 修飾によって可視化した．
B　A の標品の ATPase 活性を測定し，γ サブユニットの還元レベルに対してプロットしたもの
実験の詳細は，文献 25 を参照．

［実験方法］

1．市販のホウレンソウの緑葉 30 g に対して，あらかじめ氷冷した 60 ml の破砕用緩衝液（20 mM Tricine-NaOH（pH 8.0），50 mM NaCl，5 mM $MgCl_2$，400 mM sucrose）を加え，ミキサーで 15〜20 秒間破砕する．

2．破砕液を 4 層のガーゼで濾過して残渣を除き，3,800×g（5,000 rpm）で 5 分間遠心して沈殿を得る．

3．以降の操作は，出来るだけ氷上あるいは低温室で行う．この沈殿に破砕用緩衝液 60 ml を加え絵筆を用いて丁寧に懸濁し，同様に遠心して沈殿を得る．

4．氷冷した低張緩衝液（20 mM Tricine-NaOH（pH 8.0），50 mM NaCl，5 mM $MgCl_2$）60 ml を沈殿に加え，氷上でスターラーで 60 分間攪拌し，葉緑体を破壊する．

5．葉緑体溶液を 10,000×g で 5 分間遠心し，沈殿を回収した後，低張緩衝液で 2 回懸濁と遠心を繰り返して洗浄する．最終的に得られたチラコイド膜標品の沈殿を 4 ml の低張緩衝液に懸濁し，定法に従ってクロロフィル定量を行い，終濃度 0.5 mg Chlorophyll/ml になるように低張緩衝液で希釈して，チラコイド膜標品とする．

### 3.g.3.2 光リン酸化活性の測定

上記のようにして調製したチラコイド膜は，表在性タ

ンパク質であるフェレドキシンやフェレドキシン－NADP 還元酵素（FNR）を失っており，通常は光照射してもチラコイド膜内外にプロトン勾配を形成しない．そこで，光化学系 I 周辺だけで循環的な電子伝達を可能にする脂溶性化合物である Phenazine methosulphate を用いて擬似的に電子伝達反応を行わせ[26,27]，チラコイド膜内外のプロトン勾配を形成させることで，$CF_oCF_1$ の ATP 合成活性を測定する．従来は，ATP 合成活性の基質に用いるリン酸に $^{32}P$ 標識のものを用いることで，合成された [$^{32}P$]-ATP を定量していたが，取り扱いの煩雑さから敬遠されることが多く代替法として Luciferin-Luciferase 法を用いることが多い[28]．ただし，後者の場合には，系の中に含まれる adenylate kinase 活性（2ADP → ATP＋AMP）により生じる ATP と光リン酸化で合成された ATP を区別できないので，阻害剤の使用などに特別な注意が必要である．

[実験方法]

1．あらかじめ，光リン酸化反応液（57.5 mM Tricine-NaOH（pH 8.0），50 mM NaCl，5 mM $MgCl_2$，62.5 mM Phenazine methosulphate）を調製し，光を遮断して氷冷しておく．Phenazine methosulphate[注4] は光感受性なので，可能な限り遮光して保存する．

2．容量 4 ml の透明なガラスバイアル瓶に，光リン酸化反応液 2.4 ml，3.g.3.1 で調製したチラコイド膜標品 0.6 ml を入れ，両者を混合する．このバイアル瓶をスターラーの上にセットし，厚さ 5 cm の水フィルター（透明なガラス瓶に水道水を入れたもの）を介して，150 W のコールドランプで光照射することで室温で反応を行う．最終的な試料溶液中のクロロフィル濃度は，0.1 mg/ml とする．

3．光照射開始後，一定時間（通常は 5 分くらい）経過した後に，バイアル瓶に ADP とリン酸を添加し，ATP 合成反応を開始する．用いる ADP とリン酸の濃度はそれぞれ 1 ないし 2 mM である．

4．反応開始から一定時間経過後にバイアル瓶から 50 μl の試料を採取し，手早く氷冷した 2 μl の 10% PCA 溶液と混合して反応を停止する．

5．一連の反応停止処理が終了するまで停止した試料は氷上に放置し，その後，20,000×g で 10 分間遠心して，上清を回収する．上清 20 μl に対して 50 μl の 2 M Tris-acetate（pH 7.7）を混合し中和する．

6．中和処理した試料に含まれる ATP 量を，後述の Luciferin-Luciferase 法によって定量する．

7．バックグラウンド測定

ここで紹介した ATP 合成の測定法では，先に述べたように系内に adenylate kinase が含まれていた場合に，その働きによって生じた ATP を ATP 合成酵素が合成した ATP と識別することが出来ない．Adenylate kinase は diadenisine penta phosphate によって特異的に阻害することが出来るが，試薬が高価であることや高濃度に添加しないとその活性を必ずしも完全には抑えることが出来ないことなどの理由から，バックグラウンド測定にはあまり適していない．$CF_oCF_1$ による ATP 合成は，チラコイド膜内外に形成される $\Delta\mu H^+$ を利用するので，これを脱共役剤で解消する，もしくは，$CF_1$ に特異的な阻害剤であるテントキシンを使用した方が確実に阻害することが可能であり，これによって試料中の ATP 量の変動における ATP 合成の寄与を簡単に評価することが可能である．通常は，上記の 2 の操作の際に，50～100 μM の FCCP（脱共役剤）をあらかじめ加えておくことで，ATP 合成を完全に阻害することが可能である．テントキシンの場合には，チラコイド膜標品に対して 5 μM になるように添加し 30 分ほど室温で放置することで $CF_1$ の活性を完全に阻害することが出来る．

### 3.g.3.3　ATP の微量定量法

光リン酸化反応によって生じる ATP の定量法としては，以前は $^{32}P$ 標識のリン酸を用いることで，合成された [$^{32}P$]-ATP をイソブタノール-ベンゼンで抽出し定量していた．放射性同位体を利用すれば，反応系の夾雑化合物の影響をほとんど考慮せずに注目する反応を追跡することが可能である．しかし，最近では，放射性同位体が，その取り扱いの煩雑さから敬遠されることが多くなり，いくつかの代替法が使用されるようになってきた．例えば，HPLC の紫外可視検出器が非常に高性能になり，ATP や ADP の微量定量法としてこれを用いることが可能である．実際，ATP と ADP は $C_{18}$ カラムによる逆相クロマトグラフィーや，酸化チタンカラムによるクロマトグラフィーで高速に分離可能であるが，両者の量比に大きな差がある場合にはピークがかぶることがあり定量が難しい場合がある．測定対象とする ATP 量が十分である場合には，Hexokinase と Glucose 6-phosphate dehydrogenase を用いたカップリングアッセイを行うことにより，NADPH の生成量に変換することが可能であり，分光光度計でリアルタイムに測定することが出来る．

ATP の高感度定量法としてよく用いられる方法とし

[注4] 現在は光安定性の高い 1-Methoxy phenazine methosulphate も Sigma 社から市販されており，これを用いることもできる．

て，Luciferin-Luciferase 法がある．これは，ホタルの発光現象を触媒している Luciferase を利用して ATP の存在量を発光量に変換して測定する方法である．

$$\text{ATP}+\text{D-luciferin}+O_2 \xrightarrow{\text{Luciferase}} \text{oxyluciferin}+\text{PPi}+\text{AMP}+CO_2+\text{photon}$$

この反応は，系の中の ATP を fmol オーダーで測定することの出来る高感度な測定系であるが，混合後速やかに反応が進行してしまうため，発光現象を測定することが難しい．このため，ヒ酸ナトリウムによって Luciferase をある程度阻害した条件下で出来るだけ発光現象が持続するようにして測定を行う．実際には，測定に必要な Luciferin や Luciferase はヒ酸ナトリウムを含む緩衝液と混合キットとして Sigma 社または Roche-Diagnostics 社から販売されている．

[実験方法]

1．3.g.3.2 で中和済みの測定試料（通常 20〜40 μl 程度）に対して，等量の Luciferase 反応溶液（上記のキットを使用法に従って溶解し，氷上に保温したもの）を加え，混合 10 秒後から 1 分間に放出される Photon の量を測定する．

2．Photon の測定は，市販のルミノメーターを使用すれば，混合後の測定時間を簡単に設定することが出来るので容易である．但し，Chemiluminescence 測定用のマイクロプレートに対応した機種では，試料に反応液を投入してから一定時間後に測定することが出来ないので，ATP の定量に用いるには不向きである．

3．ルミノメーターが使用できない場合には，蛍光光度計を代用することも出来る．この場合には，蛍光光度計のセル室の励起光源側のシャッターを閉じ，さらに黒い板などで試料室への入射光を完全に塞ぎ，蛍光測定波長を 560 nm にセットする．また，蛍光側のスリット幅を最大，フォトマル電圧を最大感度になるように設定する．混合と同時に試料をセルホルダーにセットし，蛍光の時間測定を行えば，発光量をモニターすることが可能である．高感度化の工夫として，セルホルダーの蛍光入射窓と反対側に反射鏡をセットするとよい．

4．既知濃度の ATP を 3.g.3.2 で行った酸処理，中和処理したものを用いて検量線を描けば，発光量を ATP の絶対量に換算することが出来る[注5]．

[注5] Luciferase 反応は，夾雑物に敏感なので，検量線の測定に用いる ATP もあらかじめ試料と同様に酸変性・中和処理をしておかないと，正しい測定が出来ない．

### 3.g.3.4 大腸菌反転膜によるプロトンポンプ活性の測定[29,30]

チラコイド膜に結合した $F_oF_1$ に ATP 加水分解を行わせた場合には，その $H^+$ 輸送活性によりチラコイド膜の外側から内側に向かって $H^+$ が輸送され，膜内外に $H^+$ の濃度差（ΔpH）および膜電位差（$\Delta\psi$）が生じる．一般に，膜小胞内に形成される ΔpH は，9-aminoacridine，ACMA などの蛍光性 pH 指示薬を使用し，また，$\Delta\psi$ は dis-$C_3$(5) や Oxonol-V などを使用することによって，測定することが出来る[注6]．$CF_oCF_1$ の $H^+$ 輸送活性を測定する場合には，いったん光駆動により膜内外に $H^+$ の電気化学的勾配（$\Delta\mu H^+$）を形成させ，$CF_oCF_1$ を活性化（$\Delta\mu H^+$ activation）させる必要がある．本項では，$CF_1\gamma$ の調節領域および $CF_1\varepsilon$ を含む $TF_oTF_1$（キメラ $F_oF_1$）を大腸菌内に発現させ，その反転膜小胞を用いたキメラ $F_oF_1$ の $H^+$ 輸送活性の測定法を紹介する．

[実験方法]

1．$CF_1\gamma$ の調節領域および $CF_1\varepsilon$ を含む $TF_oTF_1$（キメラ $F_oF_1$）の発現プラスミド DNA を大腸菌 DK8 株にトランスフォームし，コロニーを少量の液体培地 2×YT（1.6% Bacto-tryptone，1% Bacto-yeast extract，0.5% NaCl）で培養し，その培養液を 2〜3 L の 2×YT 培地に加えて，20 時間培養する．

2．回収した菌体を 10 mM HEPES/KOH（pH 7.5），5 mM $MgCl_2$，10% glycerol で 0.4 mg protein/ml になるように懸濁し，フレンチプレス（1,500 kg/cm²）で破菌する．破菌後の溶液を 17,000×g で 20 分間遠心し，回収した上清を 240,000×g で 60 分間遠心する．得られた沈殿を 10 mM HEPES/KOH（pH 7.5），5 mM $MgCl_2$，10% glycerol で懸濁し，再度 240,000×g で 60 分間遠心する．遠心後の沈殿を 10〜20 mg protein/ml となるように 10 mM HEPES/KOH（pH 7.5），5 mM $MgCl_2$，10% glycerol で懸濁し，使用時まで−80°C で保存する．

3．$H^+$ 輸送活性を測定するため反応溶液（10 mM HEPES-KOH（pH 7.5），5 mM $MgCl_2$，100 mM KCl，0.3 μg/ml ACMA）に約 500 μg protein の酸化・還元処理した大腸菌反転膜小胞を加え，蛍光光度計のセル

[注6] 葉緑体チラコイド膜には，クロロフィルやカロチノイドなど可視領域に強い吸収をもつ色素分子が多く存在するため，これらの蛍光試薬を用いて $\Delta\mu H^+$ を測定することが難しい．これを回避する方法として，チラコイド膜に内在のカロチノイドの吸収変化を指標として測定する方法がある．

室にセットし，ベースラインが安定するまで 42°Cでインキュベートする（励起波長 410 nm，蛍光波長 480 nm）．なお，反転膜小胞の酸化・還元処理は AMS による $\gamma$ サブユニットの還元状態の確認に記載した方法と同様の条件で行う．

4．スターラーで攪拌しているセルに直接，0.5 mM ATP を投入することにより，反応を開始させる．反応を開始し，蛍光変化がプラトーに達したら，1 $\mu$g/ml FCCP を加えて反応を停止させる．実際の測定例として，葉緑体 $CF_oCF_1$ の $\gamma$ サブユニットの酸化還元調節領域を好熱菌 ATP 合成酵素に組み込んだキメラ $F_oF_1$ の $H^+$ 輸送活性と，そのチオール調節を図 4 に示した．

## 3.g.4　おわりに

$CF_oCF_1$ は，光合成の炭酸同化に必要な化学エネルギーを，光化学反応で形成される膜ポテンシャルを利用して合成し供給しているという意味で，光エネルギーを化学エネルギーに変換するプロセスの重要な酵素である．50 年以上前に Arnon によって発見された光リン酸化反応[31] は，その後，Racker の研究室を中心に活発に研究が行われ，ATP 合成酵素の研究として発展した[13−15]．研究の過程では，同種の酵素であるミトコンドリア由来の ATP 合成酵素と細菌細胞膜由来の ATP 合成酵素が，その理解に大きく貢献しており，1983 年には構成サブユニットの全遺伝子配列が完了しているし[32,33]，1994 年には呼吸鎖を構成する 5 つの複合体の中で最初に結晶構造が明らかにされている[34]．一方で，その分子機構の研究に関しては，Penefsky や Boyer らが速度論的な解析を熱心に行い[35−38]，1997 年には吉田・木下らの研究グループの手で，触媒反応中に分子の軸部分を構成するサブユニットが回転していることが顕微鏡下で実際に映像としてとらえられ[39]，分子モーターとして一躍注目されるようになった[40]．一方で，本章でも触れたように，この酵素はエネルギー供給という重要な役割を担っていることから，生理的に高度に調節されているようである．この調節機構については，細胞の状態に合わせてどのように調節が行われるのか，その実体がまだ明らかにされておらず，これから大きく研究が進展する分野であろう．

分子モーターとしての性質が明らかになって以来，ATP 合成酵素は一分子レベルの研究の材料となり，研究技術の観点からも非常に高度な物理化学的な測定の対象となっている．しかし，一方で，本章で紹介したように，$CF_oCF_1$ は葉緑体から容易に大量に調製することが可能であり，その ATP 加水分解活性やプロトン輸送活性も分光光度計や蛍光光度計だけで測定出来るなど，大学の学生実習レベルでも容易に取り扱える便利な材料である．今回，本章で紹介した方法が今後の植物生理学研究の一助になれば幸いである．

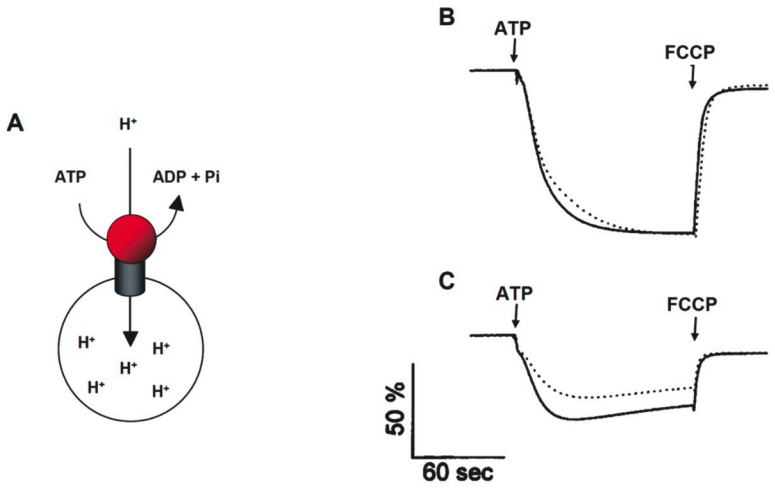



**図 4**：$F_oF_1$ による ATP 依存的 $H^+$ 輸送活性に対するチオール調節の影響
A，大腸菌反転膜小胞を用いた $H^+$ 輸送活性測定の概略図．$F_oF_1$ の $H^+$ 輸送活性による小胞内の pH の低下は蛍光性 pH 指示薬である ACMA の蛍光強度の減少により測定した．反転膜小胞は DTT，2-ME，Trx-*f*（還元条件，実線）または $CuCl_2$（酸化条件，点線）で 30°C，10 分間インキュベートした．$F_oF_1$ による $H_+$ 輸送反応（B；$TF_oTF_1$，C；キメラ $F_oF_1$）は ATP を加えることにより開始し，脱共役剤である FCCP を加えることで停止させた．

## 参考文献


1）M. Komatsu-Takaki, J. Biol. Chem. **267** (1992) P.2360.
2）M. Komatsu-Takaki, Eur. J. Biochem. **214** (1993) P. 587.
3）P. Mitchell, Biol. Rev. Camb. Philos. Soc. **41** (1966) P. 445.
4）T. Bakker-Grunwald, and K. van Dam, Biochim. Biophys. Acta **347** (1974) P.290.
5）D. W. McKinney, B. B. Buchanan, and R A. Wolosiuk, Biochem. Biophys. Res. Commun. **86** (1979) P.1178.
6）C. M. Nalin, and R. E. McCarty, J. Biol. Chem. **259** (1984) P.7275.
7）J. Miki, M. Maeda, Y. Mukohata, and M. Futai, FEBS Lett. **232** (1988) P.221.
8）M. S. Dann, and R. E. McCarty, Plant Physiol. **99** (1992) P.153.
9）U. Junesch, and P. Graber, Biochim. Biophys. Acta **893** (1987) P.275.
10）T. Hisabori, Y. Kato, K. Motohashi, P. Kroth-Pancic, H. Strotmann, and T. Amano, Eur. J. Biochem. **247** (1997) P.1158.
11）T. Hisabori, K. Motohashi, P. Kroth, H. Strotmann, and T. Amano, J. Biol. Chem. **273** (1998) P.15901.
12）H. Konno, M. Yodogawa, M. T. Stumpp, P. Kroth, H. Strotmann, K. Motohashi, T. Amano, and T. Hisabori, Biochem. J. **352** (2000) P.783.
13）M. E. Pullman, H. S. Penefsky, A. Datta, and E. Racker, J. Biol. Chem. **235** (1960) P.3322.
14）H. S. Penefsky, M. E. Pullman, A. Datta, and E. Racker, J. Biol. Chem. **235** (1960) P.3330.
15）R. E. McCarty, and E. Racker, J. Biol. Chem. **243** (1968) P.129.
16）H. M. Younis, G. D. Winget, and E. Racker, J. Biol. Chem. **252** (1977) P.1814.
17）T. Hisabori, G. Kothen, and H. Strotmann, J. Biochem. (Tokyo) **114** (1993) P.324.
18）M. L. Richter, W. J. Patrie, and R. E. McCarty, J. Biol. Chem. **259** (1984) P.7371.
19）F. Gao, B. Lipscomb, I. Wu, and M. L. Richter, J. Biol. Chem. **270** (1995) P.9763.
20）M. Sokolov, L. Lu, W. Tucker, F. Gao, P. A. Gegenheimer, and M. L. Richter, J. Biol. Chem. **274** (1999) P. 13824.
21）D. L. Stiggall, Y. M. Galante, and Y. Hatefi, Methods Enzymol. **55** (1979) P.308, P.819.
22）D. Bald, H. Noji, M. T. Stumpp, M. Yoshida, and T. Hisabori, J. Biol. Chem. **275** (2000) P.12757.
23）T. Kobayashi, S. Kishigami, M. Sone, H. Inokuchi, T. Mogi, and K. Ito, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **94** (1997) P. 11857.
24）K. Motohashi, A. Kondoh, M. T. Stumpp, and T. Hisabori, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **98** (2001) P.11224.
25）T. Hisabori, H. Konno, H. Ichimura, H. Strotmann, and D. Bald, Biochim. Biophys. Acta **1555** (2002) P.140.
26）P. H. Homann, Plant Physiol. **57** (1976) P.387.
27）B. Schmidt, Biochim. Biophys. Acta **449** (1976) P.516.
28）A. Lundin, Methods Enzymol. **305** (2000) P.346.
29）Y. Zhang, and R. H. Fillingame, J. Biol. Chem. **269** (1994) P.5473.
30）H. Konno, T. Suzuki, D. Bald, M. Yoshida, and T. Hisabori, Biochem. Biophys. Res. Commun. **318** (2004) P. 17.
31）D. I. Arnon, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **68** (1971) P. 2883.
32）M. Futai, and H. Kanazawa, Microbiol. Rev. **47** (1983) P.285.
33）J. E. Walker, and N. J. Gay, Methods Enzymol. **97** (1983) P.195.
34）J. Abrahams, A. Leslie, R. Lutter, and J. Walker, Nature **370** (1994) P.621.
35）C. Grubmeyer, R. L. Cross, and H. S. Penefsky, J. Biol. Chem. **257** (1982) P.12092.
36）R. L. Cross, C. Grubmeyer, and H. S. Penefsky, J. Biol. Chem. **257** (1982) P.12101.
37）M. J. Gresser, J. A. Myers, and P. D. Boyer, J. Biol. Chem. **257** (1982) P.12030.
38）P. D. Boyer, Biochim. Biophys. Acta **1458** (2000) P.252.
39）H. Noji, R. Yasuda, M. Yoshida, and K. Kinosita, Jr., Nature **386** (1997) P.299.
40）M. Yoshida, E. Muneyuki, and T. Hisabori, Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. **2** (2001) P.669.


### 略語一覧

| | |
|---|---|
| ACMA | 9-amino-6-chloro-2-methoxyacridine |
| AMS | 4- acetamido- 4'- maleimidylstilbene- 2,2'-disulfonic acid |
| ATP | adenosine 5'-triphosphate |
| ATPase | adenosine 5'-triphosphatase |
| DTT | dithiothreitol |
| FCCP | carbonylcyanide-4-trifluoromethoxyphenylhydrazone |
| HEPES | *N*-(2-hydroxyethyl) piperazine-*N*-2-ethanesulfonic acid |
| PCA | perchloric acid |
| TCA | trichloroacetic acid |

# 3．酵素・電子伝達成分の精製・活性測定・定量
## h．光化学系反応中心の分光学的定量

村上　明男[1)]

酸素発生型光合成生物がもつ2種の光化学系（光化学系Ⅰと光化学系Ⅱ）の量比は，光などの環境条件により適応的に制御される．本章では光化学反応中心の定量法について紹介する．

## Quantification of Photosystem Reaction Centers

Akio Murakami

Stoichiometric relationships of photosystem II, cytochrome $b_6$-$f$ and photosystem I complexes are regulated by growth conditions such as light intensity and light quality.　In this chapter, I introduce (i) estimation of photosystem I/photosystem II ratio by 77K fluorescence emission spectra and (ii) quantification of thylakoid components by oxidation-reduction difference absorption spectra.

### 3.h.1　はじめに

光化学系Ⅰと光化学系Ⅱの量比は光量や光質などの生育環境により適応的に調節され，両光化学系の励起バランスや光の利用効率が維持される[1–3)]．光合成の環境応答などの研究において光化学系反応中心の定量は重要項目であり，これまでに様々な定量法が考案されている．

光化学系Ⅰ反応中心複合体には1分子のクロロフィル$a$’($d$’)，光化学系Ⅱ反応中心複合体には2分子のフェオフィチン$a$が存在する．これらの特殊な微量色素を液体クロマトグラフィーにより精密分析する方法が開発されている[4)]．また，両光化学系複合体にはそれぞれP700やシトクトム$b_{559}$などの酸化還元成分が存在する．これらの成分の酸化還元差スペクトルによる光化学系反応中心の定量が行われている[5)]．この他，電子スピン共鳴などによる反応中心の定量法も報告されている[6,7)]．一方，生細胞や葉緑体の液体窒素温度でのクロロフィル蛍光スペクトルの解析により，光化学系Ⅰ/Ⅱの量比が推定できる[8,9)]．

本章では，蛍光スペクトル法と酸化還元差スペクトル法による光化学系反応中心の定量について紹介する．

### 3.h.2　低温蛍光スペクトルによる光化学系反応中心Ⅰ/Ⅱ量比の測定

生細胞などのクロロフィル蛍光スペクトルを液体窒素温度（77 K）で測定すると，光化学系Ⅰと光化学系Ⅱ由来の蛍光帯が明瞭に区別できる蛍光スペクトルの解析から光化学系反応中心Ⅰ/Ⅱの量比の見積もりが可能である．植物，緑藻，紅藻，一般的なラン藻（シアノバクテリア）では，685 nm付近，695 nm付近，710–740 nmに極大を示す3つの蛍光帯が普遍的に存在する（図1）[8–10)]．光化学系複合体の精製標品の解析などから，685 nmと695 nmの2つの蛍光帯は光化学系Ⅱに，710–740 nm（見かけの極大波長は生物種により異る）の蛍光帯は光化学系Ⅰに帰属することが明らかになっている[8–10)]．一方，ミドリムシ藻や褐藻などの葉緑体二次共生生物や特殊なクロロフィルをもつラン藻などの77 K蛍光スペクトルは，これらのパターンにあてはまらないことが多い．

低温蛍光スペクトルの測定では，液体窒素用のデュワー瓶やセルが必要である．蛍光分光光度計の特別付属品，あるいは特注扱いで製作したものを用いる．測定試料（生細胞，単離葉緑体，生葉，藻体）を15% ポリエチレングリコール溶液に懸濁あるいは浸漬し，専用セル（アクリル製など）に入れ液体窒素中で迅速に凍結する．蛍光分光光度計の試料室に液体窒素を満たしたデュワー瓶を設置し，試料を入れたセルをセットする．

液体窒素中での試料の状態が安定した後に蛍光スペクトル（600 nm～850 nm，励起波長435 nm付近）を測定する．なお，蛍光スペクトル測定には多くの注意点があるので成書を参照する[11)]．

光化学系Ⅱ由来の685 nmと695 nmの2つの蛍光帯（$F_{685}$と$F_{695}$）と光化学系Ⅰ由来の710～740 nmの蛍光帯（$F_{PSI}$）の間の蛍光強度（蛍光帯面積）の比〝$F_{PSI}/(F_{685}+F_{695})$〟は，反応中心Ⅰ/Ⅱ量比の指標となる[10)]．少量の試

1）神戸大学・自然科学系先端融合研究環・内海域環境教育研究センター

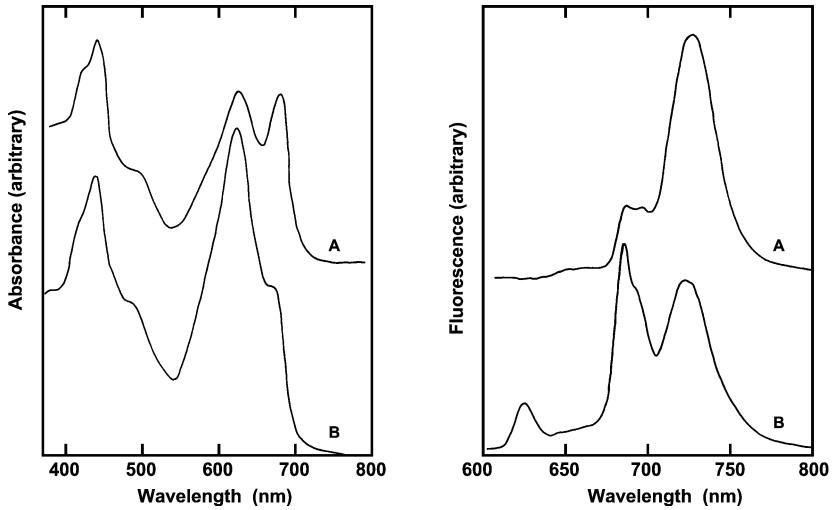



**図1**：*Synechocystis* sp. PCC6714 生細胞の室温吸収スペクトル（左）と 77 K 蛍光スペクトル（右）．A：橙色光で培養し，反応中心 I / II 量比が高くなった細胞（PS I /PS II ≒ 3），B：赤色光で培養し，反応中心 I / II 量比が低くなった細胞（PS I /PS II ≒ 1）．

料で解析できるため，光化学系量比の変化を追跡する培養実験などにおいて有用な手法である．ラン藻 *Synechocystis* sp. PCC6714（3 培養光条件），緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii*（2 培養光条件），および緑色植物 *Spinacia orelacea* について調べたところ，上記の蛍光強度比と反応中心 I / II 量比の間に高い相関性が示されている[10]．

## 3.h.3　酸化還元差スペクトルによる光化学系反応中心の定量

チラコイド膜を用いる酸化還元差スペクトルから，各光化学系固有の反応中心色素やヘムなどの構成成分を定量することができる[12]．光合成色素よる高バックグラウンド吸収もつ試料の微小吸収変化を測定するため，セルの汚れや試料液中の気泡などに対する様々な注意が必要である[12]．

### 3.h.3.1　チラコイド膜の調製

細胞や葉緑体を緩衝液（50 mM　Tricine-NaOH，pH 7.5）に懸濁し，フレンチプレスや超音波処理により破砕し断片化したチラコイド膜を得る[5]．強固な細胞壁をもつ微細藻などでは破砕処理を数回繰り返す．処理中の温度上昇や泡立ちを防ぐため，予冷や間欠処理にも留意し，必要に応じてプロテアーゼ阻害剤を添加する．

低速遠心（1,600 *g*，15 min）により未破砕の細胞などの残査を除き，遠心上清のチラコイド膜を超遠心（140,000 *g*，1 hr）で回収する．沈殿を緩衝液で再懸濁し，超遠心を繰り返すことで膜に吸着したタンパク質（フィコビリンタンパク質など）などを洗い除く．通常はこの精製段階のチラコイド膜を測定に用いるが，ショ糖密度勾配遠心により細胞壁などの夾雑物を除くこともある[13]．単離したチラコイド膜は凍結保存する．

### 3.h.3.2　光化学系 I 反応中心の定量

光化学系 I 反応中心は，光化学系 I に 1 当量存在する反応中心分子 P 700 の酸化還元差スペクトルにより定量する[5]．

チラコイド膜を緩衝液（50 mM　Tricine-NaOH，pH 7.5）に懸濁する．テフロンホモジナイザー等で均一化することで，分光測定中にチラコイド膜が凝集・沈降しないようにする．短時間の超音波処理も有効である．なお，界面活性剤を用いたチラコイド膜の可溶化は有効と思われるが，酸化剤／還元剤の添加に伴うクロロフィルなどのバックグラウンド吸収の変化が拡大する問題もあり，個別の条件検討が必要である．チラコイド膜懸濁液（20〜60 $\mu$g Chl *a*/ml，$A_{680}$ ≒ 1.5〜4.5）をセル（光路長：10 mm）に入れ，酸化剤（フェリシアン化カリウム）を終濃度 1 mM で加え撹拌する．二波長分光光度計で測定する場合は，$\lambda_1$ を 730 nm に設定し 690〜730 nm（$\lambda_2$）の波長範囲で測定する．まず酸化剤を加えた試料のベースラインを測定する．次に，還元剤（アスコルビン酸ナトリウム）を終濃度 1〜4 mM（100 倍液または粉末）で加え，ゆっくり撹拌した後差スペクトルを測定する（図 2 A）．P 700 の還元反応の飽和を確認するため，再度還元剤を少量加え同様に測定する．酸化剤や還元剤の至適濃度は予備実験により検討する．なお，酸化還元剤の過剰な添加は光合成色素の退色や膜断片の凝集・沈澱を引き起こし，バックグラウンド吸収が大きく変動することで測定が困難になる．通常のダブルビーム型分光光度計を

用いた測定では，サンプル側とリファレンス側の両方のセルにチラコイド膜懸濁液を入れ，ベースラインを補正する．次に，サンプル側に還元剤，リファレンス側に酸化剤を加え，差スペクトルを測定する．

光酸化-暗還元の差スペクトルでP 700を定量することも可能である（図2 B）．還元剤を添加したチラコイド膜懸濁液に光照射のON-OFFを繰り返してP 700の酸化-還元を誘起する．四面透明セルを用い，分光光度計の測定光束に対して直角方向の面から青色光を照射した状態でスペクトルを測定する．そのため，光電子増倍管（ホトマル）に照射光が入らないよう光学フィルターで保護する．光照射のON-OFFを繰り返して測定することにより，スペクトルの精度を向上させることができる．

**P 700濃度の算出方法**：差スペクトルの極大波長（700 nm付近）とベースライン（730 nm付近）の吸光度差を読みとる（図2参照）．報告されている差分子吸光係数（$\Delta\varepsilon_{red-ox}$＝64 $mM^{-1}cm^{-1}$）[14]を用いてP 700量（クロロフィル当たりのモル濃度）を算出する．

### 3.h.3.3 光化学系II反応中心とシトクロム $b_6$-$f$ 複合体の定量

光化学系II反応中心のP 680は酸化還元電位が非常に高いので，酸化剤・還元剤を用いた差スペクトル測定は困難である．このため，光化学系II反応中心の定量法として，酸素発生の閃光収率の測定[15]，二次電子受容体$Q_A$の分光測定[16]，放射標識した除草剤の結合，電子スピン共鳴によるチロシンラジカルの測定[6,7]などの様々な方法が開発されている．いずれ方法も特殊な装置を必要とする．ここではラン藻で開発され[5]広く適用されている[17]，シトクロム $b_{559}$ の酸化還元差スペクトルによる光化学系II反応中心の定量法を紹介する．なお，同一試料でシトクロム $b_6$-$f$ 複合体も定量可能である．

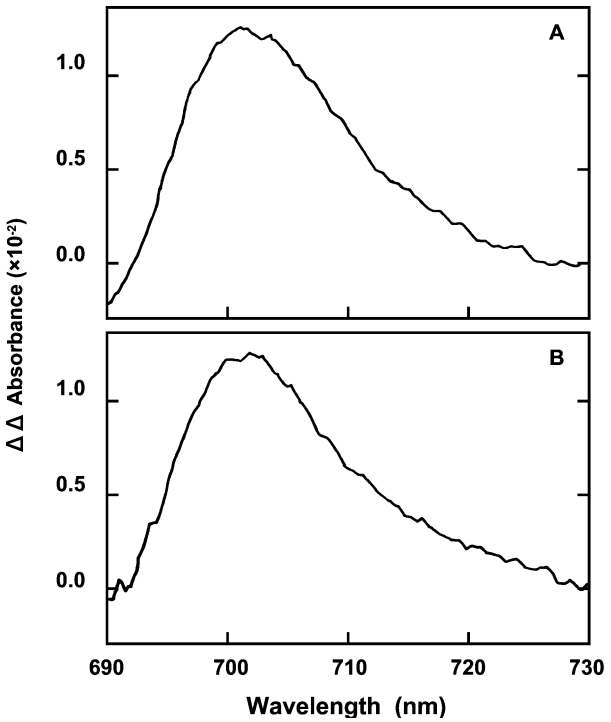



**図2**：*Synechocystis* sp. PCC6714単離チラコイド膜で測定したP 700の酸化還元差スペクトル．A：[Na ascorbate]−[K ferricyanide]の差スペクトル，B：[暗還元]−[光酸化]の差スペクトル．

チラコイド膜懸濁液（50〜100 $\mu$g Chl $a$/ml，$A_{680nm}$≒4〜8）をセル（光路長：10 mm）に入れ，酸化剤（フェリシアン化カリウム）を終濃度1 mMになるように加える．二波長分光光度計の $\lambda_1$ を570 nmに設定し，540〜580 nm（$\lambda_2$）の波長範囲で測定する．酸化剤を加えた試料に，還元剤（ヒドロキノン）を粉末で加える．ヒドロキノンの添加では高酸化還元電位のシトクロム $f$（$Em_7$≒340 mV）が還元される．この段階でベースライン測定を行う．次に還元剤（アスコルビン酸ナトリウム）を粉末で加え，静かに撹拌し1分間ほど静置した後にシトクロム $b_{559}$ の差スペクトルを記録する（図3 B）．シトクロム $b_{559}$（$Em_7$≒80 mV）還元の飽和を確認するため，差スペクトル測定を2，3回繰り返す．

同じ試料を用いて3種の還元剤を逐次加え差スペクトルを連続測定することで，シトクロム $b_6$-$f$ 複合体も定量出来る[5]．フェリシアン化カリウムとヒドロキノンの間の酸化還元差スペクトルではシトクロム $f$（$Em_7$≒340 mV），アスコルビン酸ナトリウムと亜ジチオン酸ナトリウム（ハイドロサルファイトナトリウム）の間の酸化還元差スペクトルではシトクロム $b_6$（$Em_7$≒−50 mV）の各成分が選択的に現れる（図3 A，C）．

特定の1成分だけを測定する場合は還元剤を溶液として加える場合もあるが，同一試料で3種のシトクロムを連続測定する際には，粉末（固形物）で加えることで試料の濃度変化を抑えることができる．粉末を加える際には，薬さじ（小）を用い少量（数粒）づつ分けて加え，その都度よく攪拌して溶解させる．なお，還元剤は湿気などにより変質することが多いので，デシケータ中で保管する．

**シトクロム $b_{559}$ とシトクロム $b_6$-$f$ 濃度の算出方法**：

差スペクトルの極大波長559 nmとベースラインとの吸光度差を読み取る．ベースラインが斜めになった場合は，540 nmと570 nm付近の差スペクトルの谷を直線で結びベースラインとする．シトクロム $b_{559}$ の濃度は，精

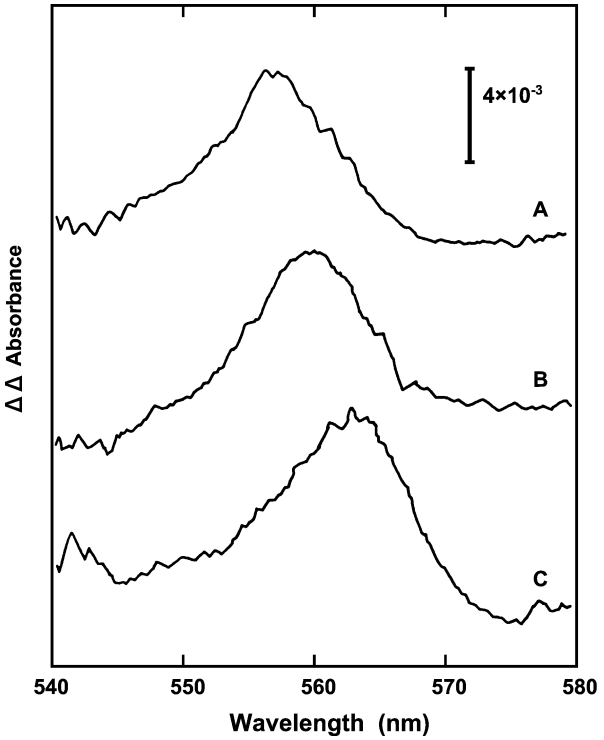



図3：*Synechocystis* sp. PCC6714 単離チラコイド膜で測定したシトクロム *f*，シトクロム $b_{559}$，シトクロム $b_6$ の酸化還元差スペクトル．A：[Hydroquinone]−[K ferricyanide]の差スペクトル（シトクロム *f*），B：[Na ascorbate]−[Hydroquinoe]の差スペクトル（シトクロム $b_{559}$），C：[Na dithionite]−[Na ascorbate]の差スペクトル（シトクロム $b_6$）．

製標品の還元型スペクトルのモル吸光係数[18]をもとに計算した559 nmでの差吸光係数 $\Delta\varepsilon_{red-ox}=15\ mM^{-1}cm^{-1}$ を用いて計算する[19]．なお，光化学系II反応中心複合体当たりのシトクロム $b_{559}$ の数（1あるいは2個）については，光化学系II反応中心の精製標品では1個との報告があるが，まだ決着していない[20–23]．我々はラン藻 *Synechocystis* sp. PCC6714 についてのシトクロム $b_{559}$，アロフィコシアニン(フィコビリソームのコア)，シトクロム $c_{550}$ などの量，および酸素発生の閃光収量との相互比較を行い，光化学系反応中心II当たり2分子のシトクロム $b_{559}$ ヘムが含まれると判断している[5]．しかし吸光係数の扱いの問題などもあり今後も検討が必要である．

シトクロム *f* とシトクロム $b_6$ の差吸光係数としては，それぞれ $\Delta\varepsilon_{red-ox}=21\ mM^{-1}cm^{-1}$（554/557 nm）と $\Delta\varepsilon_{red-ox}=14\ mM^{-1}cm^{-1}$ (563 nm) を用いる[24,25]．シトクロム $b_6$-*f* 複合体当たり1分子のシトクロム *f* と2分子のシトクロム $b_6$ が含まる．

## 3.h.4 おわりに

本章ではラン藻での測定例を中心に光化学系反応中心などの定量法について紹介したが，緑色植物オオムギ[26]，クロマツ[27]，緑藻 *Chlamydomonas*[28]，紅藻 *Porphyra*[29]でも同様な測定が可能である．

## 参考文献


1）Y. Fujita, A. Muakami, K. Aizawa & K. Ohki. The Molecular Biology of Cyanobacteria, ed D. A. Bryant, Kluwer Academic Publishers, (1994) P.677.

2）Y. Fujita, K. Ohki, & A. Murakami, Algal Adaptation to Environmental Stresses: Physiological, Biochemical and Molecular Mechanism. eds L. C. Rai & J. P. Gaur, Springer-Verlag, (2001) P.135

3）村上明男・佐藤公行「光シグナルトランスダクション」（編集）蓮沼・木村・徳永，シュプリンガー・フェアラーク東京，(1999) P.101

4）渡辺正・仲村亮正・小林正美，日化2002（2002）P.117

5）Y. Fujita & A. Murakami, Plant Cell Physiol. **28** (1987) P.1547.

6）R. Danielsoon, P.-Å. Albertsson, F. Mamedov & S. Styring, Biochim. Biophys. Acta, **1608** (2004) P.53

7）D.-Y. Fan, A. B. Hope, P. J. Smith, H. Jia, R. J. Pace, J. M. Anderson & W. S. Chow, Biochim. Biophys. Acta **1767** (2007) P.1064

8）N. Murata & K. Satoh, Light Emission by Plant and Bacteria, eds. Govindjee et al., Academic Press, (1986) P. 137.

9）佐藤公行，植物細胞工学 **1**（1989）P.170

10）A. Murakami, Photosyn. Res. **53** (1997) P.141

11）三室守，実験生物学講座4生化学実験法（編集）金谷・藤田，丸善（1983）P.205

12）三室守・村上明男，藻類 **44**（1996）P.9

13）N.-H. Chua & P. Bennoun, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **72** (1975) P.2175

14）T. Hiyama & B. Ke, Biochim. Biophys. Acta **267** (1972) P.160

15）M. Kawamura, M. Mimuro & Y. Fujita, Plant Cell Physiol. **20** (1979) P.697

16）A. Melis, Phil. Trans. R. Soc. Lond., B**323** (1989) P.379

17）L. Yu, J. Zhao, U. Mulenhoff, D. A. Bryant & J. H. Golbeck, 1993. Plant Physiol. **103** (1993) P.171

18）H. S. Garewal, & A. R. Wasserman, Biochemistry **13** (1974) P.4063.

19）W. A. Cramer & J. Whitmarsh, Ann. Rev. Plant Physiol. **28** (1977) P.133

20）D. H. Stewart & G. W. Brudvig, Biochim. Biophys. Acta, **1367** (1998) P.63

21) O. Kaminskaya, J. Kern, V. A. Schuvalov & G. Renger. Biochim. Biophys. Acta, **1708** (2005) P.333
22) I. Yruela, F. Miota, E. Torrado, M. Seibert & R. Picorel, Eur. J. Biocheim. **270** (2003) P.2268
23) G. M. MacDonald, R. J. Boerner, R. M. Everly, W. A. Cramer R. J. Debus & B. A. Barry Biochemistry **33** (1994) P.4393.
24) H. Böhme, B. Plezer & P. Böger, Biochim. Biophys. Acta, **592** (1980) P.528
25) A. L. Suart & A. R. Wasserman, Biochim. Biophys. Acta, **314** (1973) P.284
26) K. Ohashi, A. Murakami, A. Tanaka, H. Tsuji & Y. Fujita, Plant Cell Physiol. **33** (1992) P.371
27) K. Shinohara, A. Murakami & Y. Fujita, Plant Physiol. **98** (1992) P.39
28) A. Melis, A. Murakami, J. A. Nemson, K. Aizawa, K. Ohki & Y. Fujita, Photosyn. Res. **47** (1996) P.253
29) S. Abe, A. Murakami, K. Ohki, Y. Aruga & Y. Fujita, Plant Cell Physiol. **35** (1994) P.901

# 4．タンパク質複合体の単離
## a．系1複合体の精製法

高橋裕一郎[1)]，兒玉なつ美[1)]，高橋　拓子[1)]

系1複合体は，チラコイド膜に存在し，多数のサブユニットとコファクターから構成される超分子複合体である．光エネルギーを利用して，プラストシアニンもしくはシトクロム $c_6$ からフェレドキシンへの電子伝達反応を駆動する．本章では，系1複合体を可溶化したチラコイド膜から精製する方法を紹介する．

## Purification and characterization of photosystem I complex

Yuichiro Takahashi, Natsumi Kodama, Hiroko Takahashi

Photosystem I catalyzes a light-induced electron transfer from plastocyanin or cytochrome $c_6$ to ferredoxin and forms chlorophyll-protein complex consisting of more than ten subunits and one hundred cofactors. In this chapter, biochemical purification of photosystem I complex by sucrose density gradient ultracentrifugation and DEAE column chromatography is described.

### 4.a.1　チラコイド膜上のタンパク質複合体

酸素発生型光合成の電子伝達系の成分は，シアノバクテリアや葉緑体のチラコイド膜に存在する．これらの成分として，チラコイド膜のストロマ側の表面に結合するフェレドキシン(Fd)とフェレドキシンNADP還元酵素(FNR)，ルーメン側の表面に結合するプラストシアニン(Pc)やシトクロム $c_6$ (Cyt. $c_6$)などの可溶性タンパク質，チラコイド膜の脂質二重層中に存在するプラストキノン，および系1(PSI)，系2(PSII)，シトクロム $b_6f$ (Cyt. $b_6f$)などのチラコイド膜内に埋め込まれた多数のポリペプチドから構成される複合体がある．これらの複合体を精製するには，チラコイド膜を界面活性剤で可溶化し(3章6.g)，カラムクロマトグラフィーなどの生化学的な精製操作が必要である．チラコイド膜上には，光合成電子伝達系の成分の他に，ATP合成酵素も多量に存在し，電子伝達系の複合体を精製する時に混入してくる．

### 4.a.2　系1複合体の機能と構造

系1は光を利用してPcもしくはCyt. $c_6$ を酸化しFdを還元する反応を触媒する．系1に含まれる電子伝達成分は，初期電子供与体P700 (Chl $a$ とChl $a$' のヘテロ二量体)，初期電子受容体 $A_0$ (Chl $a$)，電子受容体 $A_1$ (ナフトキノンであるフィロキノンもしくはメナキノン)，$F_X$ (4Fe-4Sの鉄硫黄中心)，$F_A$ と $F_B$ (4Fe-4Sの鉄硫黄中心)である(図1)[1,2]．その他に，アンテナとして機能するChl $a$ と $\beta$-カロテンおよび脂質が存在する．

系1複合体は10以上のサブユニットと100以上のコ

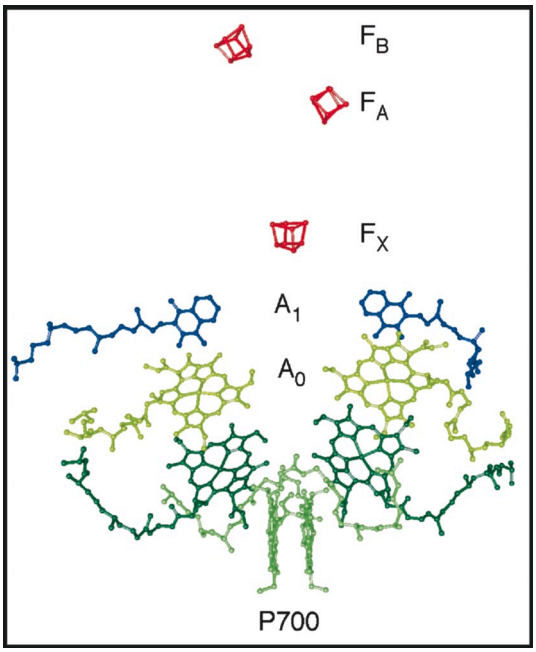



図1：系1電子伝達成分の配置
6分子のChl $a$，2分子のフィロキノン(ビタミン $K_1$)，3つの4Fe-4S中心の空間配置を示す．Chl $a$ とフィロキノンは対称的に配置される．効率は異なるが，P700から $F_X$ までのいずれの電子伝達成分も反応に関与すると考えられている．

1）岡山大学大学院自然科学研究科

ファクターから構成されている．シアノバクテリアと植物の複合体の機能と構造はよく保存されている[3,4]．表1にシアノバクテリアと植物の系1サブユニットの組成をまとめた．両者は10種のサブユニットPsaA-F, I-Lを共通にもつ．主な相違は，シアノバクテリアにはPsaMとPsaXがあり，植物にはPsaG，PsaH，PsaN，PsaOがある．シアノバクテリアの系1複合体と高等植物のPSI-LHCI複合体の結晶構造がそれぞれ2.5と3.4Åの分解能で決定された（図2）[1,2]．

シアノバクテリアの系1複合体は三量体を形成するが，高等植物や藻類の系1複合体は集光性クロロフィルタンパク複合体（LHCI）を結合する単量体である．温和な界面活性剤でチラコイド膜を可溶化すると，シアノバクテリアからは三量体の複合体が，高等植物や藻類からはPSI-LHCI複合体が単離される．一般的には，PSI-LHCIからLHCIを取り除くには，比較的強い界面活性剤を使用する必要がある．LHCIのPSIへの結合は，生物種によっては弱いものもあり，精製の過程で遊離することがある．

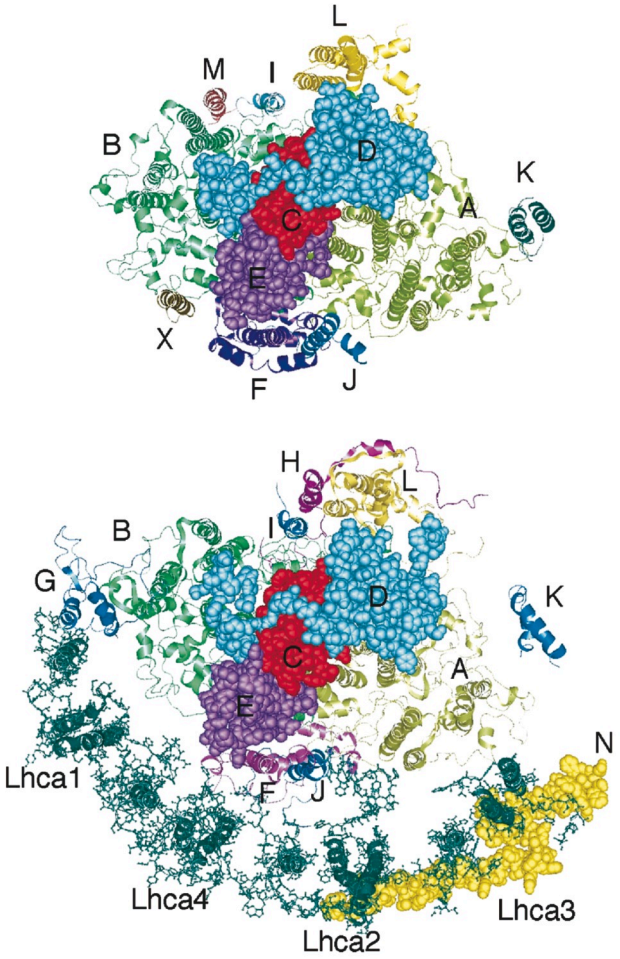



**図2**：系1複合体の構造
（上）シアノバクテリアのPSI複合体の構造[2]，（下）植物のPSI-LHCI複合体[1]．膜貫通ヘリックスをもつサブユニットはリボンで，表在性サブユニットはボールで示した．シアノバクテリアにはPsaMとPsaXが存在するが，植物にはPsaG，PsaHとPsaNの他に4つのLHCI（Lhca1-4）が存在する．

系1サブユニットのうち，PsaAとPsaBは相同性をもつサブユニットで，ヘテロ二量体の反応中心を構成する．電子伝達成分のうちP 700，$A_0$，$A_1$，$F_X$および多くのアンテナChl $a$と$\beta$-カロテンを結合する．この反応中心複合体は構造が安定で，SDSのような強いイオン性の界面活性剤で低温処理しても解体されにくい．このことから，グリーンゲル（Green Polyacrylamide Gel Electrophoresis）と呼ばれる低温で行うSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動では，PSIはCPIと呼ばれるクロロフィルタンパクとして分離される．最終電子受容体である$F_A$と$F_B$はPsaCに結合している．PsaCは反応中心のストロマ側に結合し，それを覆うようにPsaDとPsaEが存在し，Fd結合部位を形成する．PsaFは膜を貫通するヘリックスを1つもち，残りの親水領域は反応中心のルーメン側に存在し，Pc結合部位を形成する．このサブユニットの近傍に膜貫通ヘリックスをもつPsaJとルーメン側に存在する表在性のPsaNが存在する．結晶構造によるとPsaNは反応中心よりLHCIに接近した場所に存在する．

反応中心のストロマ側およびルーメン側に存在する表在性サブユニットの他に，反応中心の疎水領域の外辺部に膜貫通ヘリックスをもつサブユニットが存在する．PsaH，PsaI，PsaLはLHCIの結合部位の反対側に存在する．PsaIとPsaLは反応中心に直接結合し，PsaHはその外側に結合している．PsaHは三量体を形成するシアノバクテリアの系1複合体には存在しない．結晶構造には存在しないが，高等植物にはこの近傍にPsaO[5]とPsaP[6]が存在すると考えられている．PsaH，PsaLとPsaOはステート遷移に関与すると考えられている．その他に，PsaKとPsaGが高等植物には存在し，4量体LHCIの両端に位置し，その構造の安定化に関与すると考えられている．LHCIが存在しないシアノバクテリアではPsaKのみが存在する．

## 4.a.3　系1複合体の精製

系1複合体はチラコイド膜上に存在するため，精製のためにはシアノバクテリアや高等植物および藻類の葉緑体からチラコイド膜を単離する．チラコイド膜標品から細胞壁，核酸およびデンプンなどの夾雑物をあらかじめ除いておくと，チラコイド膜の可溶化効率を高め，最終

**表1**：系1複合体のサブユニット組成

| サブユニット | 遺伝子の場所 | 膜貫通ヘリックス | 機能 | 保持する生物種 |
|---|---|---|---|---|
| psaA | 葉緑体 | 11 | 反応中心 | 共通サブユニット |
| psaB | 葉緑体 | 11 | 反応中心 | 共通サブユニット |
| psaC | 葉緑体 | 0 | 鉄硫黄中心 | 共通サブユニット |
| psaD | 核 | 0（ストロマ側） | Fd 結合 | 共通サブユニット |
| psaE | 核 | 0（ストロマ側） | Fd 結合 | 共通サブユニット |
| psaF | 核 | 1 | Pc 結合* | 共通サブユニット |
| psaG | 核 | 2 | LHCI の安定化 | 植物，藻類 |
| psaH | 核 | 1 | ステート遷移* | 植物，藻類 |
| psaI | 葉緑体（核） | 1 | | 共通サブユニット |
| psaJ | 葉緑体 | 1 | | 共通サブユニット |
| psaK | 核 | 2 | LHCI の安定化* | 共通サブユニット |
| psaL | 核 | 3 | ステート遷移* | 共通サブユニット |
| psaM | シアノバクテリア | 1 | － | 主にシアノバクテリア |
| psaN | 核 | 0（ルーメン側） | | 植物，藻類 |
| psaO | 核 | 2 | ステート遷移* | 植物，藻類 |
| psaP | 核 | 2 | リン酸化 | 植物 |
| psaX | シアノバクテリア | 1 | 3量体の安定化 | シアノバクテリア |
| Lhc1 | 核 | 3 | 集光 | 植物，藻類 |
| Lhc2 | 核 | 3 | 集光 | 植物，藻類 |
| Lhc3 | 核 | 3 | 集光 | 植物，藻類 |
| Lhc4 | 核 | 3 | 集光 | 植物，藻類 |

* 植物，藻類における機能

標品への夾雑物も減らす効果がある．EDTA や NaBr などで処理すれば，チラコイド膜から表在性タンパク質や ATP 合成酵素を除くことができる．ATP 合成酵素は系1標品に混入すると完全に取り除くことが難しいので，あらかじめチラコイド膜から除去しておくことは重要である．

チラコイド膜を界面活性剤で可溶化するときに用いる界面活性剤の選択は重要である（3章6．g を参照）．一般にイオン性界面活性剤を使うと，構成サブユニットが脱落したり，光合成色素が遊離したり，活性が低下したりすることがある．逆に余分なサブユニットを取り除きたい時には有効である．系1複合体の精製によく使われるのは，非イオン性界面活性剤である．構造と活性に対して温和で，イオン交換クロマトグラフィーや等電点電気泳動などの精製手法も利用できる．最もよく使われている信頼性の高い界面活性剤はドデシルマルトシドである．系1の構造や活性に対して温和であり，チラコイド膜の可溶化効率も優れている．以前よく使われた Triton X-100 は安価であるが，クロロフィルなどの色素の結合や吸収スペクトルを変化させることがある．ジギトニンはタンパク質の構造や活性に対して温和であるが，高価で可溶化効率が低く，生物材料によっては系1複合体の可溶化には利用できない．

可溶化したチラコイド膜から系1複合体を精製する時によく使われる方法は，ショ糖密度勾配超遠心法，陰イオン交換クロマトグラフィー，ゲルろ過クロマトグラフィーなどである．その他に，Isoelectric Focusing やヒドロキシアパタイトクロマトグラフィーが考えられるが，あまり用いられていないので，ここでは触れない．

ショ糖密度勾配超遠心法は，超遠心機とスウィングローターを使用する．アングルローターでも分離は可能で，遠心時間は大幅に短縮されるが，分離は悪くなる．ショ糖密度勾配超遠心法の利点として，不溶性の夾雑物が遠心チューブの底に沈殿するので，容易に取り除くことができる，タンパク質がバンド状に分離されるので希釈されない，操作が簡単である，などがある．欠点としては，遠心に時間がかかる，多量のサンプルの分離に向かない，などがあげられる．

陰イオン交換クロマトグラフィーには，DEAE と MonoQ がよく用いられる（3章6．f）．溶出溶液中の塩（例えば NaCl）濃度を増加させて分離するので，塩濃度を高くすると遊離するサブユニットを保持したまま複合

体を精製したいときには注意が必要である．一般的に使われているのは，ポリマーの支持体をもつ担体（TOSO の DEAE Toyopearl など）である．以前よく使われた DEAE セルロースは分離能が高くなく，最近ではあまり使われない．

カラムは自分で担体を詰めるか，すでに担体がカラムに詰めてあるプレパックカラムのいずれかを選択する．筆者らの経験からは，イオン交換クロマトグラフィーに関しては，自分で担体を詰めたカラムでペリスタポンプを用いて分離しても，プレパックカラムで中速クロマトグラフィー装置（FPLC や Äkta）を用いて分離しても，得られる結果はあまり変わらないことがある．ただし，後者の方は溶出速度が高いので，時間短縮と省労力になる．

ゲルろ過クロマトグラフィーはタンパク質の大きさの差を利用して分離する方法であり，ショ糖密度勾配超遠心法での分離とよく似ている．したがって，ショ糖密度勾配超遠心法で分離できなかった夾雑物は，この方法ではうまく除去できない場合がある．しかし，サイズが近接しているサンプル同士の分離は，フラクションコレクターにより細かく分画できるので，ゲルろ過クロマトグラフィーが優れている．しかし，時間がかかること，少量のサンプルしか処理できない，などの欠点がある．また，自分で担体を詰めたカラムを利用する場合，１メートルほどの長いカラムが必要である．ゲルろ過カラムクロマトグラフィーに関しては，プレパックカラムを用いた中速クロマトグフィー装置を利用すると，時間的にも分離においても優れた結果が得られる．

## 4.a.4　緑藻クラミドモナスから系１複合体の精製

系１複合体の精製は数多く報告されている．しかし，標準的な方法はなく，用いる生物材料や目的とする標品の活性や組成により精製法は最適化しなければならない．ここでは，緑藻クラミドモナスのチラコイド膜から PSI-LHCI を精製する方法について述べる[7,8]．他の材料から精製する場合は，この方法を改良して最適化すればよい．

### 4.a.4.1　チラコイド膜から表在性タンパク質の除去

用いる生物材料によるが，ATP 合成酵素が系１標品に混入すると除去するのが難しい．そこで，可溶化前にチラコイド膜から ATP 合成酵素を除去する．このとき，弱く結合するサブユニットが系１複合体から脱離しないように注意する．ATP 合成酵素の混入が問題でない場合は，この操作は必要ない．以下の操作中では，サンプルは常に氷で冷やし，溶液は十分に冷やして使用する．

［実験方法］

１．チラコイド膜（0.8–1.0 mg Chl/ml）に冷やした 5 M NaBr 溶液を最終濃度が 2 M になるように加える．
２．氷上においたサンプルをゆっくりかくはんしながら５分間放置する．
３．冷やした脱イオン水で 5 倍以上希釈する．
４．遠心管に移し，15000× $g$ で 5 分間遠心分離後，上澄みを取り除く．
５．沈殿したチラコイド膜を冷やした脱イオン水に懸濁する．
６．再び 15000× $g$ で 5 分間遠心分離後，上澄みを取り除く．
７．後の操作のことを考慮して，適切な溶液に懸濁する．

### 4.a.4.2　チラコイド膜の可溶化

用いる材料によって，最適可溶化条件は異なる．チラコイド膜の濃度，界面活性剤の種類と濃度，可溶化時間と温度，などを検討する必要がある．

図 3 に，クラミドモナスのチラコイド膜（0.8 mg Chl/ml）を異なる濃度のドデシルマルトシドで可溶化し，ショ糖密度勾配超遠心でクロロフィルタンパク質を分離したときのパターンを示す．0.4％ドデシルマルトシドで可溶化すると，密度の高い（チューブの底に近い）画分に分離されるクロロフィルタンパク質の量が増加する．また，LHCII の分離位置がショ糖密度のより高い画分に分離される．特に LHCII は PSII と同じ画分に分離されている．PSII-LHCII が分離されたというより，両者が同じ位置に分離されたのである．PSII-LHCII 複合体は，さらにショ糖密度の高い画分に分離される．可溶化時のドデシルマルトシド濃度を高くすると，LHCII のバンドがショ糖密度勾配の上部に移動し，PSI や PSII の分離も明瞭になる．

遠心チューブの底に注目すると，いずれの可溶化条件でも不溶性の沈殿物の量が少ないことが分かる．これは，細胞膜，デンプン，核酸などの混入の少ないチラコイド膜は，低濃度のドデシルマルトシドでもよく可溶化されるからである．チラコイド膜に不純物が多く含まれているときは，沈殿が多くなる．この時は，可溶化条件を強くするより，チラコイド膜から不純物を除去する方がよい．

図 3 に示した結果から，１）活性やサブユニットをよく保持した標品を単離したい時は，0.8％もしくはそれ以下の濃度で可溶化する，２）混入物の少ない標品を得る

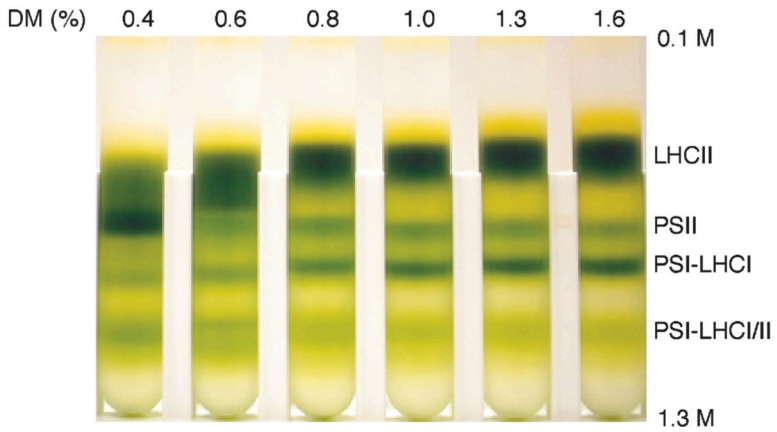



**図3**：チラコイド膜の可溶化条件のクロロフィルタンパク質の分離パターンへの影響
同じ濃度のチラコイド膜を異なる濃度のドデシルマルトシド（0.4から1.6%）で可溶化し，ショ糖密度勾配超遠心法で分離した．生物材料によりクロロフィルタンパク質の可溶性が異なるので，界面活性剤の種類や濃度の最適化するとよい．

ときは，1.0-1.6%ドデシルマルトシドで可溶化する，と判断される．

シアノバクテリアのチラコイド膜を同様に可溶化すると，主に二量体PSIIと三量体PSIに相当する2本のバンドが密度勾配の上部と下部に分離される．

### 4.a.4.3　ショ糖密度勾配超遠心法によるPSIの分離

用意する溶液，5 mM Tricine-NaOH，pH 8.0および0.05%ドデシルマルトシドを含むショ糖溶液(0.2，0.4，0.6，0.8，1.0 M)．50 mM NaClを加えるとバンドの分離がシャープになることがあるので，用いる生物材料に応じて検討するとよい．

**[実験方法]**

1．スウィングローター用の遠心チューブに0.2〜1.0 Mのショ糖の直線的濃度勾配を作成する．
2．チラコイド膜（1.0 mg Chl/ml）に10%(w/v)ドデシルマルトシド溶液を最終濃度0.8から1.2%になるように加える．
3．可溶化は氷上で5-10分間行う．
4．可溶化したチラコイド膜をショ糖密度勾配の上に加える．
5．13 ml程度のチューブ（Beckman SW41 Ti）を使用する場合，可溶化物を0.5 ml（最大1 ml）加え，288000× $g$ で14時間，4 ℃で遠心する．38 ml程度のチューブ（Beckman SW28）を使用する場合は，2.0-2.5 ml加え，141000× $g$ で24時間，4 ℃で遠心する．
6．上から，LHCII，PSII，PSI-LHCIの順番でクロロフィルタンパク質が分離される（図3-5）．
7．上から3番目のバンドを分画する．

図4にショ糖密度勾配を変えたときのクロロフィルタンパク質の分離パターンのの様子を示した．0.1〜1.0 Mの勾配のときは，1番上のバンドのLHCIIと2番目のPSIIの分離がよい．0.4〜1.0 Mの勾配のときは，LHCIIを結合したPSI-LHCI-LHCIIのようなPSI-LHCIより大きな複合体を分離するときに最適である[9]．

### 4.a.4.4　陰イオン交換クロマトグラフィーによる分離

ショ糖密度勾配超遠心法により，緑のバンドが明瞭に分離されたなら，系1はかなり純化されているはずである．しかし，少量のLHCIIやPSII複合体の混入が残る．そこで，精製の第2段階として，陰イオン交換クロマトグラフィーを行う．この2段階の精製により，ほとんど夾雑物のないPSI標品が得られる．

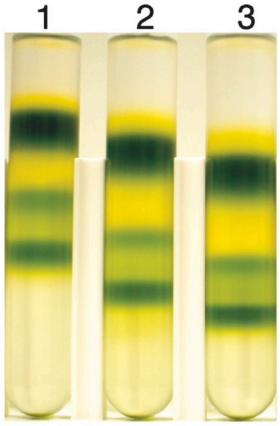



**図4**：異なるショ糖密度勾配でのクロロフィルタンパク質の分離
(1) 0.4〜1.0 M，(2) 0.25〜1.0 M，(3) 0.1〜1.0 Mのショ糖密度勾配．生物種によりクロロフィルタンパク質の分離パターンが変わるので，異なるショ糖密度勾配を作成し最適な分離条件を見出すことが大切である．

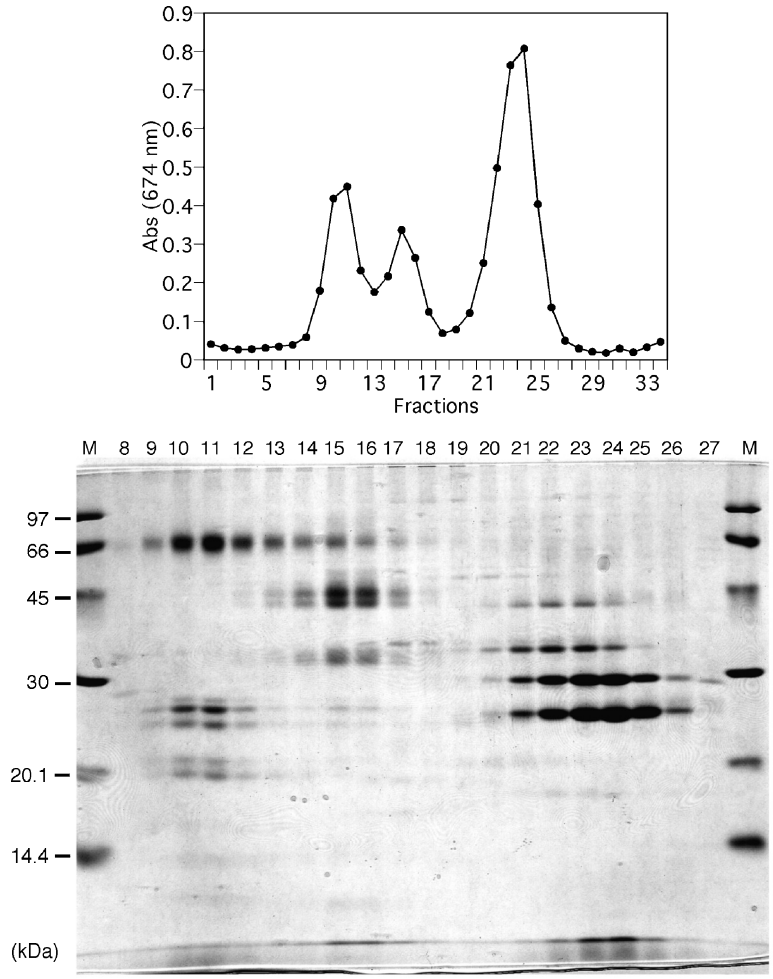



**図5**：ショ糖密度勾配超遠心法による系1複合体の分離
(上) ショ糖密度勾配をチューブの底から分画した．右から LHCII，PSII，PSI-LHCI のピークが分離した．(下) 各画分のポリペプチド組成を SDS-PAGE で分析すると，画分 21-25 には LHCII の 25-30 kDa ポリペプチドが，画分 15-16 には，PSII の 32 kDa と 45 kDa ポリペプチドが，そして画分 9-12 には PSI-LHCI のポリペプチドが検出される．

1．DEAE カラム（DEAE Toyopearl 650S，直径 2.5 cm，高さ 8 cm）を作製する．
2．ショ糖密度勾配超遠心法で分離した PSI-LHCI (0.1 mg Chl/ml，70-80 ml）をカラムに吸着させる（吸着された緑のバンドは高さ 2 cm 程度)．カラムを 50 mM Tris-HCl，pH 7.5，0.05% DM 溶液で 1 カラム体積分洗う．溶液の流速は 0.4 ml/min.
3．0-150 mM 直線的濃度勾配の NaCl を含む溶出液（300 ml）で溶出する（図 7)．
4．最後に 150 mM NaCl を含む溶液（100 ml）で溶出する．
5．溶出液の 280 nm での吸光度を測定し，溶出曲線を求める．
6．溶出曲線の形が左右対称であれば，単一の成分が含まれている．そうでない場合は，PSI 標品に夾雑物が含まれる，もしくは PSI 標品が不均一であると考えられる．

プレパックカラムとして MonoQ（HR 5-5）（0.5 cm x 5 cm，カラム体積 0.982 ml）や DEAE 8 cm TOYOPEARL TSKGEL (0.5 cm×7.5 cm) が利用できる．

### 4.a.4.5 系1標品の濃縮
### [ポリエチレングリコール（PEG）沈殿]

ポリエチレングリコール（PEG6000）存在下で遠心すれば，クロロフィルタンパク質は効率よく沈殿するので，濃縮や界面活性剤や溶液の交換に利用できる．この方法は，体積の大きいサンプルにも適応できる．また，高濃度に濃縮するのにも適している．

1．サンプル溶液の塩濃度が低い時は，50 mM NaCl もしくは 1 mM $MgCl_2$ を加える．
2．50% PEG6000 溶液を少しずつ混ぜながら，最終濃

度 10–12%になるように加える．溶液が濁ってくる．
3．160000× $g$ で 30 分遠心する．
4．遠心後，上澄みを捨て，沈殿を適当な溶液に懸濁する．

［スピンカラムによる濃縮］

少量のサンプルを 10 倍程度濃縮するのに適している．
1．サンプル用が 0.5 ml 以下の場合，フィルター付マイクロチューブ（UFC30GV00，MILLIPORE，Durapore PVDF 0.22 $\mu$m）にサンプルを入れる．
2．微量冷却遠心機で，12000× $g$ で 1–4 分遠心する．
3．濃縮されたサンプルを回収する．

［小さな陰イオン交換カラムによる濃縮］

この方法は，量の多い低塩濃度の溶液中のサンプルの濃縮に適している．
1．DEAE カラム（直径 1 cm，高さ 3–5 cm）を準備する．ただし，カラムのサイズは濃縮するサンプルの量により異なるが，小さくすれば，より高く濃縮できる．
2．サンプルを吸着させる．
3．サンプルが溶出される塩濃度より高い濃度の塩を含む溶液で一気に溶出させる．

### 4.a.4.6　系 1 複合体標品の性質

#### 4.a.4.6.1　室温での吸収スペクトルと低温での蛍光スペクトル

緑藻クラミドモナスのチラコイド膜をドデシルマルトシドで可溶化後に分離した LHCII，PSII，PSI-LHCI の室温の吸収スペクトルを図 6 に示した．LHCII の Chl $a$ と Chl $b$ の赤色部の吸収極大の波長はそれぞれ 672 nm と 651 nm である．青色部には顕著なカロテノイドの吸収ピークが 473 nm にある．PSII の Chl $a$ の赤色部の吸収極大の波長は 674 nm である．Chl $b$ を含まないので，650 nm 付近の吸収が低くなっている．シアノバクテリアの PSII も同様の吸収スペクトルを示す．PSI-LHCI は赤色部の吸収極大の波長は 679 nm で，Chl $b$ の吸収は 650 nm 付近に小さなふくらみとして存在する．シアノバクテリアの PSI は LHCI を結合しないので，Chl $b$ に相当する吸収はないが，赤色部の Chl $a$ の吸収極大の波長は同様に長波長側にシフトしている．以上の結果から，クロロフィルタンパク質を分離したとき，それらの吸収スペクトルを測定すれば，おおよその同定は可能である．しかし，Triton X-100 はクロロフィルフォームに影響を与えるので，吸収スペクトルの形は影響を受ける．

低温の蛍光発光スペクトルも図 7 に示したように LHCII，PSII，PSI-LHCI（もしくは PSI）で異なる．クラミドモナスの PSI-LHCI のスペクトルのピークの波長は，シアノバクテリアの PSI 複合体や植物や他の藻類の PSI 複合体のピーク波長（730 nm 付近）と比べかなり短波長側にシフトしている．

#### 4.a.4.6.2　ポリペプチド組成

PSI 標品のサブユニット組成は，SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法で分析する（3 章 6．a）．また，抗体が手に入れば，ウェスタンブロッティング法により分析する（3 章 6．h）．3–5 $\mu$g Chl に相当する標品を 2 % SDS と 5 %メルカプトエタノールもしくは 0.1 M ジチオスレイトール（DTT）で処理し，ポリペプチドを変性させてから，電気泳動にかける．系 1 複合体は安定なので，室温では反応中心が完全に変性せず，クロロフィルを結合した CPI として分離されることがある．このため，サンプルを 100°C，1 分で熱処理する．しかし，疎水性の高い反応中心ポリペプチド（PsaA と PsaB）はこの処理により不可逆的に会合することがある．この場合，60°C程

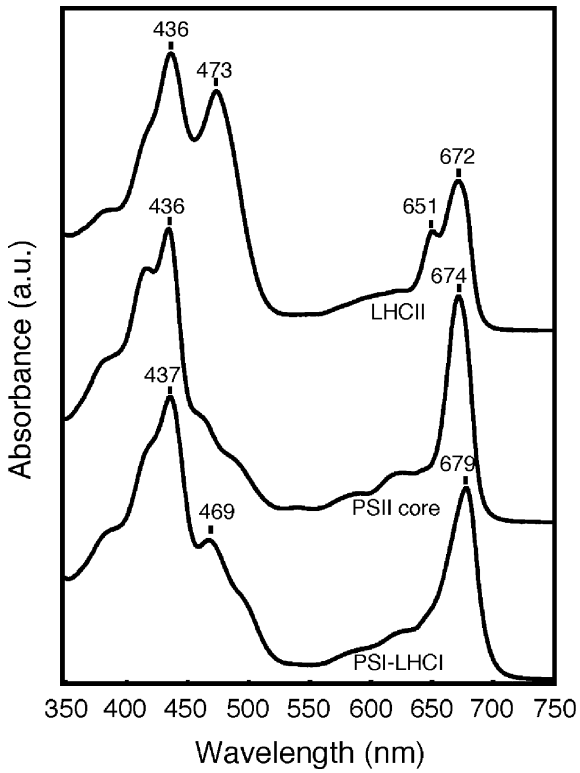



図 6：クラミドモナスのクロロフィルタンパク質の室温における吸収スペクトル
LHCII にはクロロフィル $b$ の吸収に相当する 651 nm のピークがあり，カロテノイドの吸収が大きい 473 nm のピークが高くなっている．PSII にはクロロフィル b が含まれないので，650 nm 付近の吸収が他と比べて低くなっている．PSI-LHCI は少量のクロロフィル $b$ を結合するので，651 nm 周辺の吸収はピークではなくわずかなふくらみとして観察される．それぞれの複合体のクロロフィル $a$ の赤色部の吸収極大の波長の違いに注目すると，精製中の各画分の同定に役立つ．

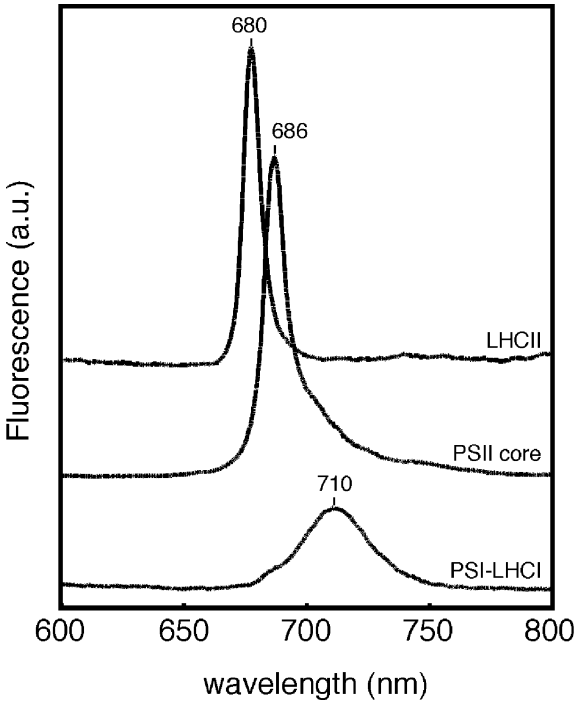



**図7**：クラミドモナスのクロロフィルタンパク質の液体窒素温度の蛍光発光スペクトル
感度が高いので，少量のサンプルでも測定でき，便利である．クラミドモナスの PSI-LHCI のピークはシアノバクテリアや高等植物のものに比べ，20 nm 以上短波長にシフトしているので注意が必要である．

度で 5–10 分熱処理して変性させる．系 1 サブユニットの分子質量は，大きいものがおよそ 80 kDa で小さいものでおよそ 4 kDa と広い範囲にまたがっている．系 1 の全ポリペプチドを一度に分析するには，電気泳動にはアクリルアミド濃度に勾配をつけたグラディエントゲルを用いる．

PSI サブユニットの SDS-PAGE における相対的な泳動度は，種や SDS-PAGE システムにより異なる．図 9 にクラミドモナスの PSI-LHCI 標品のサブユニットの分離パターンを示す．ショ糖密度勾配超遠心法で，PSI-LHCI はきれいに分離されているが，図 9 の矢頭で示したように，PSI 以外のポリペプチドの混入が認められる．DEAE クロマトグラフィーでの精製後には，混入していたサブユニットはほとんど除かれている．

反応中心サブユニットの PsaA と PsaB は 66 kDa 付近に幅広い 1 本のバンドとして検出される．クラミドモナスには Lhca が 9 種存在し，そのうち 7 種の量が多いので CBB 染色で検出できる[8]．ここでは Lhca-1 の a〜g として示してあるが，相対的泳動度が近いので，完全に分離されたバンドとしては検出されない．その他に，小型のサブユニットのバンドが数多く認められる．PsaD

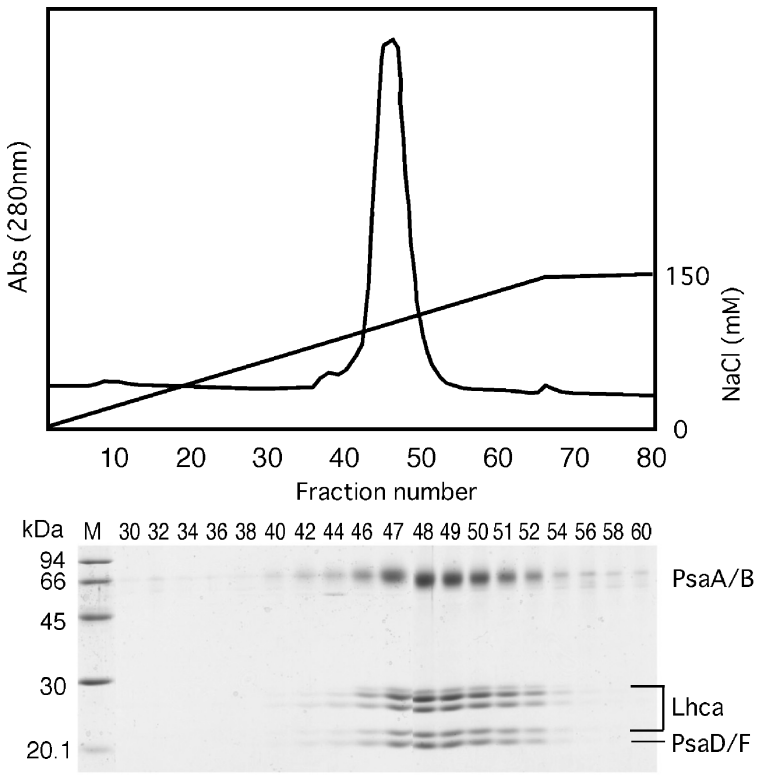



**図8**：ショ糖密度勾配超遠心法で分離した系 1 複合体の DEAE カラムクロマトグラフィーによる分離
サンプルを DEAE Toyopearl 650S に吸着させた後，溶出バッファーの塩濃度を 0 から 150 mM NaCl に直線的に増加させた．100 mM NaCl の溶液付近に PSI-LHCI が溶出された．混入していた 60 kDa 付近のポリペプチドが画分 44 および画分 54−60 に分離され，最終標品から取り除かれた．

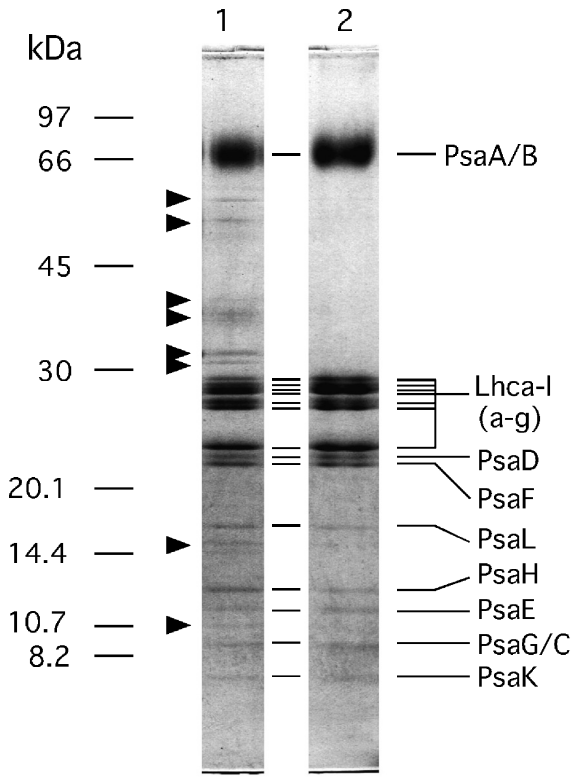



**図9**：PSI-LHCI 標品のサブユニット組成
1；ショ糖密度勾配超遠心法で精製した標品，2；1を更にDEAE クロマトグラフィーで精製した標品．これらの標品には小型のサブユニット PsaI と PsaJ が存在するが，染色度が低いため検出できない．しかし，ウェスタン分析によると，これらのサブユニットは遊離することなく存在する．

と PsaF は接近した2本のバンドとして分離し，さらに相対泳動度が大きい順番に PsaL，PsaH，PsaE，PsaG，PsaC，PsaK が検出される．ここでは PsaG と PsaC は接近して分離されるので1本のバンドに見える．さらに5 KDa 程度の PsaI と PsaJ が遊離した色素の少し上側に分離されるが，染色されにくいため，ここでは検出されていない．しかし，ウェスタン分析ではこれらの小型のサブユニットの存在は確認できる．クラミドモナスでは，PsaN と PsaO は遊離しやすく，精製の過程で失われるため，PSI 標品には検出されない．

## 文献


1）A. Amunts, O. Drory, & N. Nelson, Nature **447** (2007) P.58.
2）P. Jordan, P. Fromme, H. T. Witt, O. Klukas, W. Saenger, & N. Krauss, Nature **411** (2001) P.909.
3）P. E. Jensen, R. Bassi, E. J. Boekema, J. P. Dekker, S. Jansson, D. Leister, C. Robinson, & H. V. Scheller, Biochim Biophys Acta **1767** (2007) P.335.
4）N. Nelson & C. F. Yocum, Annu Rev Plant Biol **57** (2006) P.521.
5）J. Knoetzel, A. Mant, A. Haldrup, P. E. Jensen, & H. V. Scheller, FEBS Lett **510** (2002) P.145.
6）A. Khrouchtchova, M. Hansson, V. Paakkarinen, J. P. Vainonen, S. Zhang, P. E. Jensen, H. V. Scheller, A. V. Vener, E. M. Aro, & A. Haldrup, FEBS Lett **579** (2005) P.4808.
7）I. Sugimoto & Y. Takahashi, J Biol Chem **278** (2003) P.45004.
8）Y. Takahashi, T. A. Yasui, E. J. Stauber, & M. Hippler, Biochemistry **43** (2004) P.7816.
9）H. Takahashi, M. Iwai, Y. Takahashi, & J. Minagawa, Proc Natl Acad Sci U S A **103** (2006) P.477.

# 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2a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 $\mu$mole $O_2$/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．

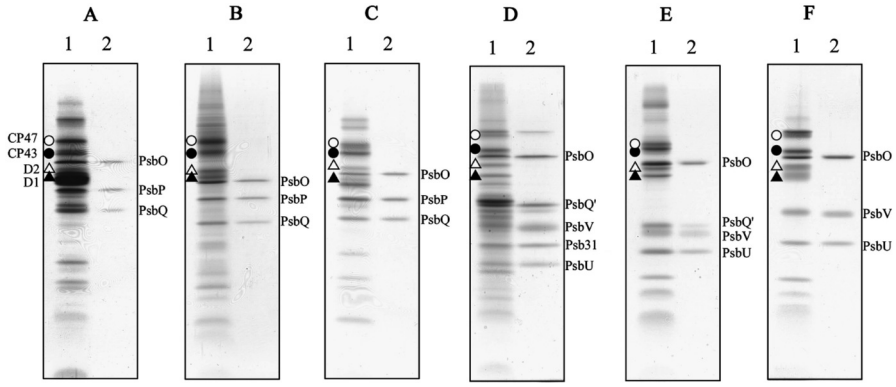



**図1**：各種生物から単離された系II標品（レーン1）とその表在性タンパク質（レーン2）．表在性タンパク質は系II標品を1.0 M Tris（pH 8.0）で処理し遊離させたもの．A．ホウレンソウ；B．緑藻クラミドモナス（*Chlamydomonas reinhardtii*）；C．ユーグレナ（*Euglena gracilis*）；D．珪藻（*Chaetoceros gracilis*）；E．紅藻（*Cyanidium caldarium*）；F．シアノバクテリア（*Thermosynechococcus vulcanus*）．（文献19より改変）．

### 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-$\beta$-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-$\beta$-D-glucoside）[8]，オクチルチオグルコシド（OTG, *n*-octyl-$\beta$-D-thioglucoside）[9]，あるいはドデシルマルトシド（DDM, *n*-dodecyl-$\beta$-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 $\mu$mole $O_2$/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

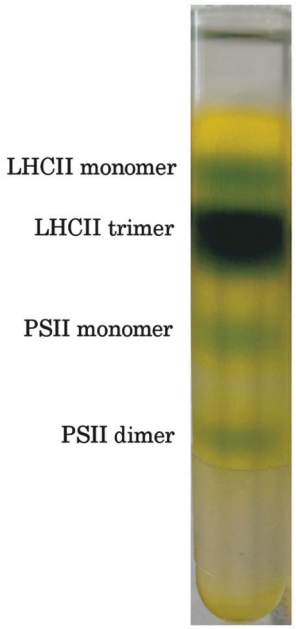



**図2**：ホウレンソウBBY標品をDDMで可溶化し，0.3–0.7 Mショ糖密度勾配にかけたときのパターン．

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 $\mu$mole $O_2$/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 $b$-559$\alpha$, $\beta$ 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 x$g$，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 $b$-559$\alpha$, $\beta$ 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 $\mu$m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 $\mu$mole $O_2$/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 $\mu$mole $O_2$/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 $\mu$m 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 $\mu$mole $O_2$/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 $\mu$mole $O_2$/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 $\mu$mole $O_2$/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 $\mu$m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 x$g$，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 x$g$，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 $\mu$mole $O_2$/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 x$g$，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

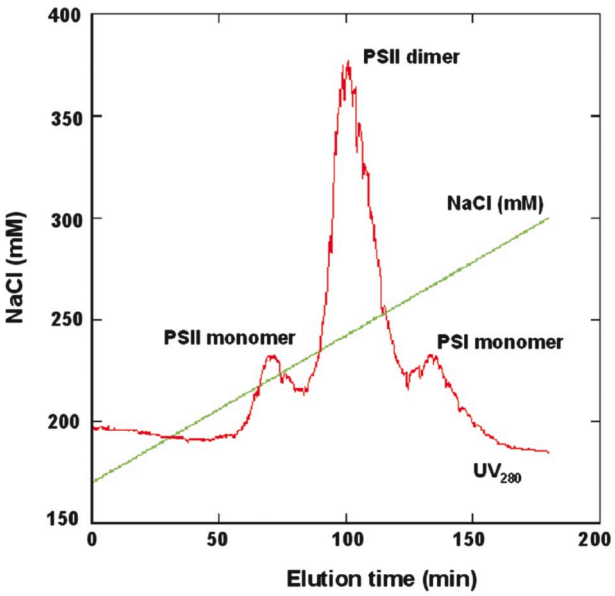



図 3：*T. vulcanus* 由来粗系II（LDAO-PSII）を DDM によって可溶化し，Q Sepharose High Performance カラムにかけた時の溶出パターン．

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 $\mu$mole $O_2$/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 $\mu$m 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 $\mu$mole $O_2$/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.

# 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-$\beta$-D-maltoside（$\beta$-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）$\beta$-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．$\beta$-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% $\beta$-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．

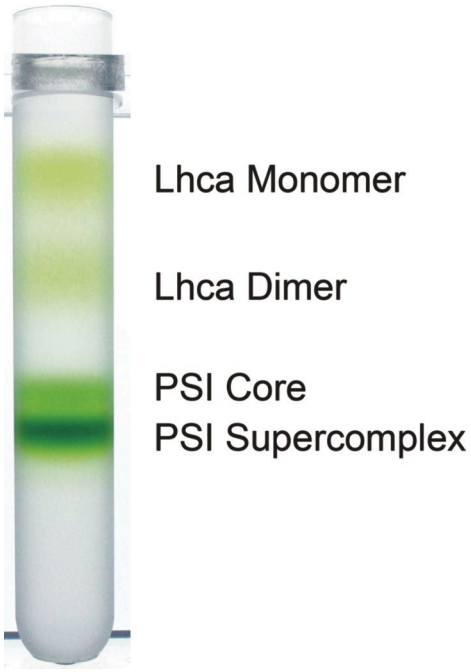



**図 1**：ホウレンソウより単離したチラコイド膜から光化学系Ⅰ超複合体（PSI-SC）を調製し，Zwittergent 法で LHCI を解離させ，ショ糖密度勾配超遠心によって LHCI を分画した．

### 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-

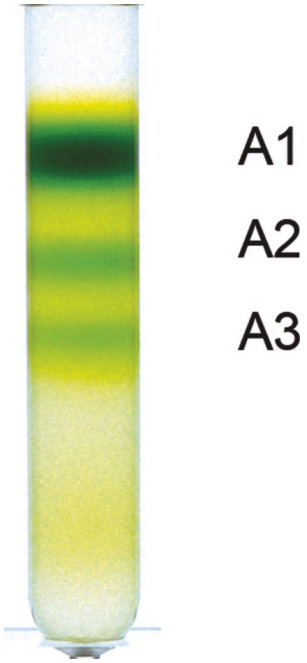



**図2**：クラミドモナスより単離したチラコイド膜を可溶化し，ショ糖密度勾配超遠心によってLHCII(A 1)を分画した．

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.

# 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 3.2 b 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 〜 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 μm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.×30 cm）に100 μlロードする．カラム流速が0.5 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$A_{280}/A_{800}$＝1.7〜1.9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 ℓで約10 g程度の湿菌体が得られる．Yeast extractがなくても生育するが，得られる菌体量は5 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 mMリン酸（pH 7.0）（Buffer B）で懸濁し，880 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 mMで

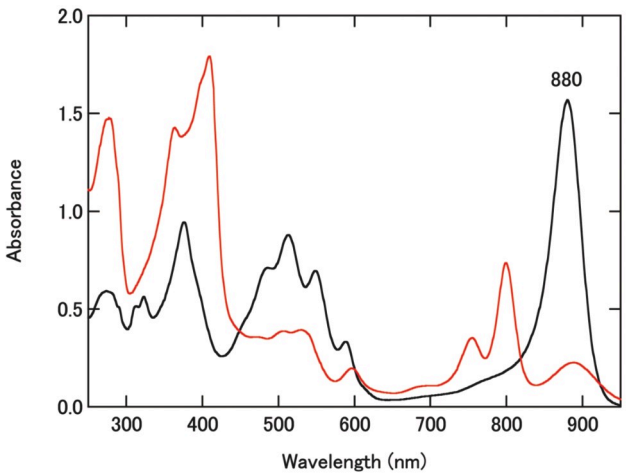



**図1**：*Thermochromatium tepidum*由来RC（赤）と*Rhodospirillum rubrum*由来LH1（黒）の吸収スペクトル

加える．LDAOを終濃度で0.35%になるように加えて，室温（約23℃）で60分間撹拌する．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×g，60 min，4 ℃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 ℃で60分間撹拌する．150000×g，60 min，4 ℃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 mM Tris-HCl（pH 8.0），0.05（v/v）LDAOで透析を4 ℃で12〜24時間で行う．透析後の試料を4 ℃で陰イオン交換カラム（TOSOH, TSK Gel DEAE-TOYOPEARL 650S 25×250 mm）で精製を行う．50 mM Tris-HCl（pH 8.0），0.09（v/v）%LDAO（Buffer C）を用いて，流速1.5 ml/minでカラム体積の約2.5倍量程度で平衡化する．LH1を溶出するためのNaCl濃度条件は120分間で60 mMから250 mMまで直線勾配をかける．LH1は100 mM〜130 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 ℃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 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%（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×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×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 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 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×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 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×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×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×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×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．

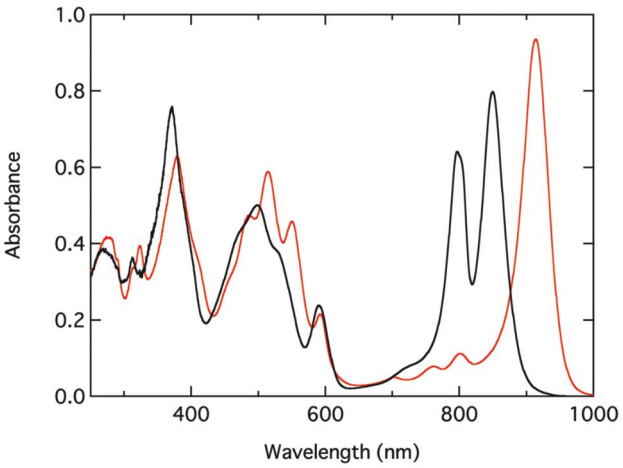



図 2：*Thermochromatium tepidum* 由来 LH1-RC（赤）と LH2（黒）の吸収スペクトル

### 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%

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 $\mu$M E-64，1 $\mu$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砕する（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 の遠心で未破砕細胞を除き，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砕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 分間緩やかに撹拌する．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 分間緩やかに撹拌する．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 分間の緩やかな撹拌，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 分間緩やかに撹拌することにより，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[7]，$\beta$-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[8]

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）で破砕する．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，破砕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

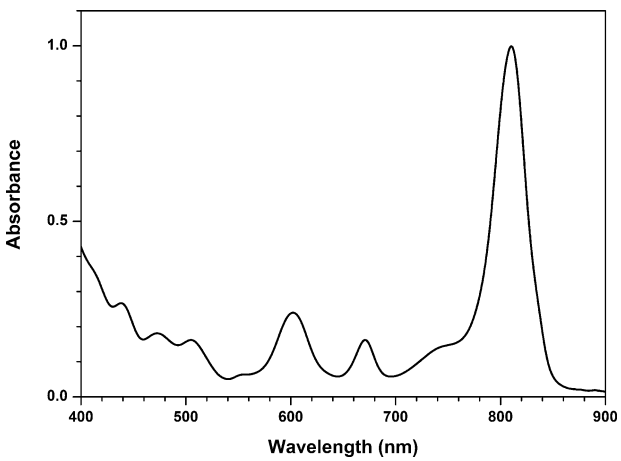



図 3：*Chlorobium tepidum* 由来 RC の吸収スペクトル

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収する．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)]．それゆえ可溶化・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．

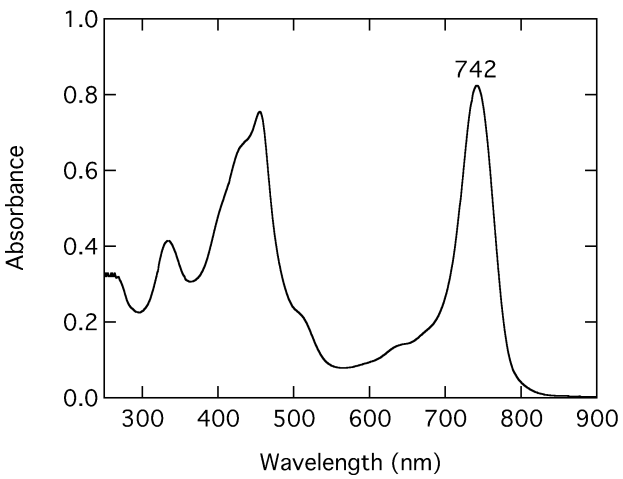



**図 4**：*Chlorobium tepidum* 由来クロロゾームの吸収スペクトル

**【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 *Heliobacterium 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) で破砕する．12000×g，10 min の遠心で未破砕細胞を除き，180000×g, 60 min の超遠心で細胞膜画分を回収する．緩衝液 A で $A_{790}$＝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 分間緩やかに撹拌する．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**

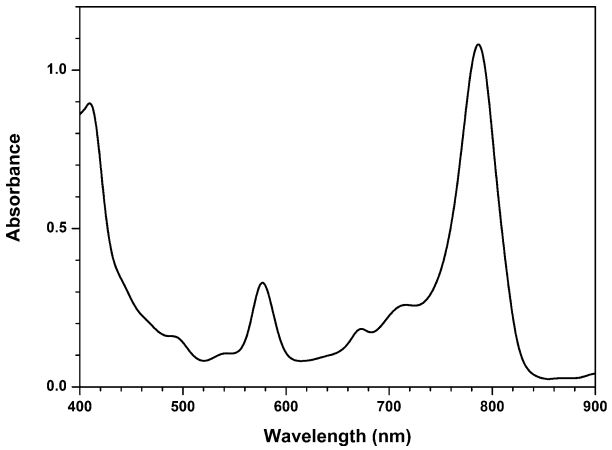



図5：*Heliobacterium modesticaldum* 由来 RC の吸収スペクトル

(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, Biochimi. Biophys. Acta **848** (1986) P.69.

9）Z.-Y. Wang, G. Marx, M. Umetsu, M. Kobayashi, M. Mimuro & T. Nozawa, Biochimi. 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

# 4．タンパク質複合体の単離
## e．フィコビリソーム

近藤久益子[1)]，佐藤　桃子[1)]，広瀬　　侑[1)]，渡邊　麻衣[2)]，池内　昌彦[1)]

フィコビリソームはシアノバクテリア，灰色藻，紅藻に広く存在するフィコビリタンパク質の集光超分子複合体で，光エネルギーの捕集と光環境への順化，分配や貯蔵タンパク質として重要な役割を果たしているが，まだ不明な点が多い．

## Phycobilisome

Kumiko Kondo, Momoko Sato, Yuu Hirose, Mai Watanabe, Masahiko Ikeuchi

Phycobilisome is a light harvesting-supercomplex in rhodophytes, glaucocystophytes and cyanobacteria. It is located on the thylakoid membrane and transfers light energy to photosystems. In this chapter, we introduce methods of its isolation and analysis in cyanobacteria and glaucocystophytes. The protocol of the complementary chromatic adaptation (acclimation) was also described.

### 4.e.1　フィコビリソームの基本コンセプトと問題

フィコビリソームはコアとロッドからなる超複合体である[1,2)]．そのコアやロッドは，互いによく似たフィコビリタンパク質のドーナツ状のディスクとこれをつなぐリンカータンパク質から構成されており，さらにコアとロッドの間も別のリンカータンパク質によって連結されている（図1）．フィコビリタンパク質とは開環テトラピロールであるフィコビリン色素がタンパク質に共有結合したものである（3章5参照）ディスクとは，各フィコビリタンパク質の$\alpha/\beta$サブユニット複合体を単位（モノマーと呼ぶ）として，ドーナツ状の3量体もしくは3＋3＝6量体を形成したものである．ロッドの遠位部分はフィコエリスリン6量体（これをもたない種もある），近位部分はフィコシアニン6量体，コアの主成分はアロフィコシアニン3量体が中核を形成している．フィコエリスリン$\alpha$サブユニット（CpeA）は，フィコシアニン$\alpha$サブユニット（CpcA），アロフィコシアニン$\alpha$サブユニット（ApcA）と相同で，フィコエリスリン$\beta$サブユニット（CpeB）は，フィコシアニン$\beta$サブユニット（CpcB），アロフィコシアニン$\beta$サブユニット（ApcB）と相同で，しかも$\alpha$サブユニットと$\beta$サブユニットも相同性はやや低いが起源をともにする．つまり，フィコビリソームの主要な構成成分は単一の色素タンパク質の遺伝子の重複によって生じたといえる．リンカータンパク質の詳細は省くが，通常は色素を結合せず，ドーナツ状の3/6量体ディスクの内側に入り込んでディスク同士を連結する役割をもつ（図1）．これらの成分はシアノバクテリア，灰色藻，紅藻に広く分布しており，よく似たフィコビリソームを形成し，光化学系の集光装置として機能している．このようなフィコビリソームの分子質量は1 MDaを越えるまさに超複合体である．また，ここでは述べないが，束状のフィコビリソームなど多様な構造が知られている[3)]

＊注：フィコビリタンパク質の分野では，遺伝子は*cpcA*などと表記するが，タンパク質は$\alpha^{PC}$・$\beta^{PC}$（フィコシアニンモノマーの場合）などと表記する．これでは初心者には対応関係がわかりにくいので，本項では$\alpha^{PC}$・$\beta^{PC}$をCpcA・CpcBなどと統一的に表記する．

上述のように，フィコビリソームのロッドの遠位にフィコエリスリン，近位にフィコシアニン，コアにアロフィコシアニンが配置されており，それぞれが～560 nm，～620 nm，～650 nmの吸収ピークを示す．光エネルギーが波長に反比例するので，この配置は遠位の高い光エネルギーを吸収してコアの低いエネルギー準位への励起エネルギーの効率的な伝達を実現している．しかし，ここで述べた基本成分以外の微量成分のフィコビリタンパク質や種ごとに異なる多様なリンカータンパク質の存在は，フィコビリソームの物質的理解がまだ十分でないことを示している．また，各フィコビリタンパク質が特定波長の光を吸収するしくみ，フィコビリソームの自己会合のしくみ，フィコビリソームから光化学系複合体へ

1）東京大学大学院総合文化研究科広域科学専攻

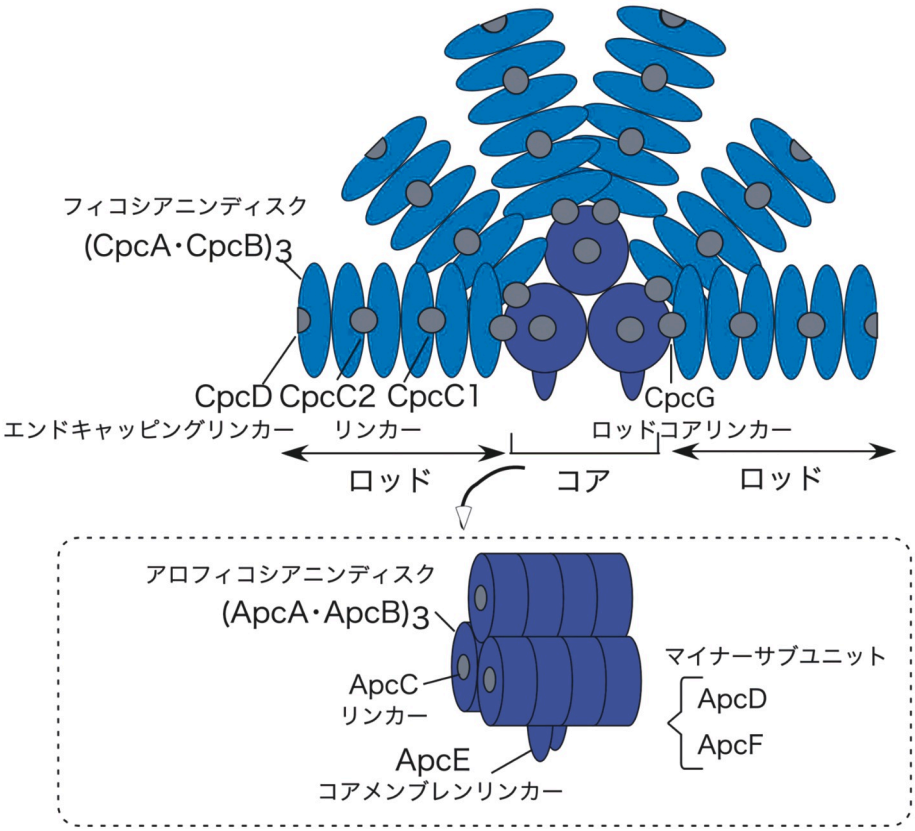



**図1**：*Synechocystis* sp. PCC 6803 のフィコビリソームのモデル図.

の効率のよい光エネルギー転移のしくみ，さらに栄養飢餓や光環境の変化に応じた発現や分解の誘導など，解明されていない問題が山積している.

フィコビリソームは 1970 年代から活発に研究されてきたが，フィコビリソームやそのフィコビリタンパク質の構造解析やゲノム解読の進展から予測されるフィコビリソーム遺伝子の機能や構造の多様性が次々に明らかになってきており，フィコビリソーム像を見直す時期に来ているといえる.

## 4.e.2 フィコビリソームの単離

フィコビリソームの構造を維持するにはリン酸やクエン酸などの多価アニオンの高濃度の緩衝液が必要である[4,5,6]. このような溶液を用いたフィコビリソームの古典的な単離法は現在でももっとも有効である. これらの溶液にはアンチカオトロピック効果があるが，シアノバクテリアの細胞内のイオン組成と関係があるかどうか明らかではない. この条件で細胞を破砕すると，フィコビリソームの一部はチラコイド膜に結合している. Triton X-100 処理はこの膜結合フィコビリソームを抽出するのにある程度有効であるが，完全には抽出しきれない.

### [実験方法] フィコビリソームの単離

*以下，全ての作業は 20°C付近で行う[5].

1．シアノバクテリアの細胞を 0.8 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) に懸濁し，細胞を破砕する. 破砕にはフレンチプレスやビードビーターを用いる. フレンチプレスの場合，1500 kg $cm^{-3}$ で 2 回もしくは 3 回通す. 冷却式のビードビーター (BioSpec 社) の場合，氷水のジャケットで包み，30 秒で 4 回程度破砕する.[注1]

(1') 灰色藻の場合，低張ショックで単離したシアネル (色素体) を，0.8 M リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) に懸濁し，リゾチーム (終濃度 1 mg $mL^{-1}$) を加える. ペプチドグリカン層は薄いので，すぐにシアネルは破裂するが，通常 25°C で 15 分間静置する. これを遠心回収して，再度リン酸溶液に懸濁し，最終 2 % の Triton X-100 を加え，15,000 xg，5 分間遠心し，

[注1] フィコビリソームは熱変性しやすく，不溶性の凝集物をつくる. したがって，内部から熱を発生するビードビーターを使用するときは，過熱に注意する. 容器は冷たくても，内部は過熱していて不溶化することがある. 細胞は破砕できているのに，フィコビリタンパク質が沈澱するときは，破砕時間もしくは回転数を下げることを検討する.

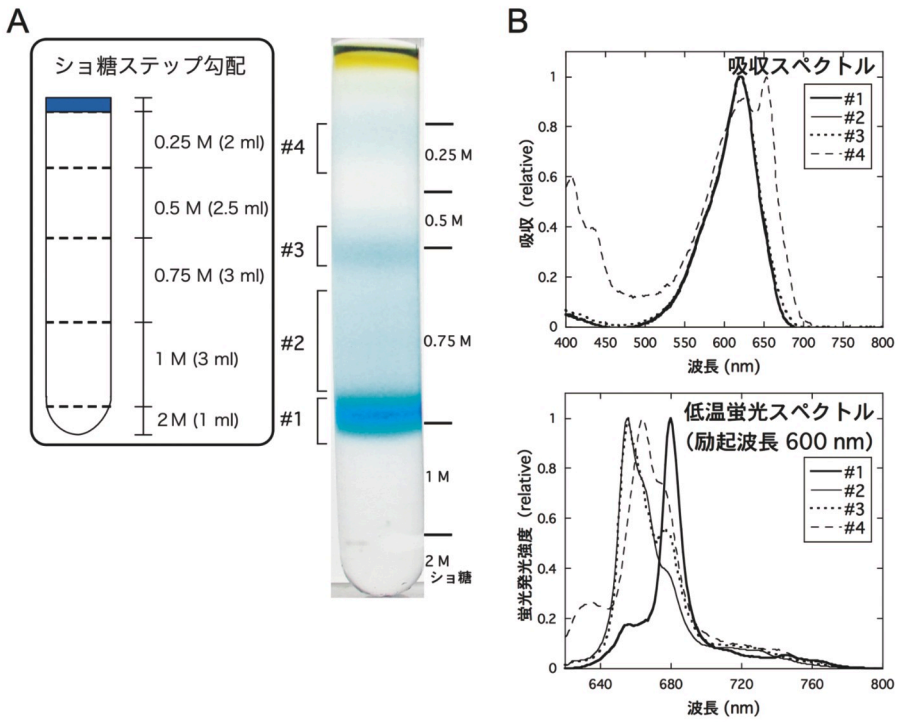



**図2**：ショ糖密度ステップ勾配* と *Synechocystis* sp. PCC 6803 における分離例（A），および分光学的解析例（B）．13PET チューブ（Hitachi），スイングローター P65ST（Hitachi）を使用．

上清を回収する．これを上記のショ糖密度勾配遠心法で分画する．なお，フレンチプレスや超音波処理をしているプロトコルもあるが，リゾチームで十分である．

2．終濃度が 2％になるように Triton X-100 を添加する（20％(w/v) ストックを使用）．

3．遮光して 30 分間振盪する．

4．遠心（20,000 xg，20 分間）によって層分離させる．上にクロロフィルを含む Triton X-100 層，下にフィコビリソームを含む水層の 2 層に分離する．[注2]

5．下側の青い水層を回収し，0.8 M リン酸（pH 7.0）を含む 10-50％(w/v) ショ糖密度勾配（連続密度勾配またはステップ勾配，図 2 A）に重層する．なお，上のステップ 4 で，二層に分かれなかった場合はそのまま重層する．[注3]

6．超遠心（130,000 xg，15 時間）によってフィコビリタンパク質複合体を分画する．

結果：一般に，intact フィコビリソームが最も下に，フィコビリタンパク質のサブユニットが上部に回収され，Triton X-100 で可溶化されたクロロフィル類は通常は最上部に留まる（図 2 A および図 3）．図 3 は，各種の生物のフィコビリソームの分画は，intact フィコビリソームの多様性を示す．

## ［実験方法］単離フィコビリソームの解析

青色層をシリンジ等によって分画後，構成タンパク質とその会合状態を SDS-PAGE や吸収・蛍光スペクトル測定によって推定することができる．

・SDS-PAGE

基本的にフィコビリソームの構成タンパク質は 7-9 kDa のコアリンカーおよびロッドエンドキャッピングリンカー，約 15-20 kDa のフィコビリタンパク質，30-40 kDa のロッドコアリンカーおよびロッドリンカー，70-120 kDa のコアメンブレンリンカー（アンカーともいう）に分けられる．このうち，コアメンブレンリンカーは限定分解を受けやすく，複数のバンドに分かれることが多い．またシアノバクテリアにおいては，フィコビリソームと相互作用している FNR も確認することができ

[注2] 0.8 M リン酸緩衝液と 2% Triton X-100 溶液は 2 層に分離し，上層にはクロロフィル，下層にはフィコビリソームが回収されるが，試料が多すぎると層分離しなくなったり，下層にクロロフィルが混入しやすくなるが，その場合でも次の密度勾配遠心で分画できることが多い．

[注3] われわれは，密度勾配の作製にグラジエントマスター（トーワラボ）を使用している．これは 2 種の液を重層して一定時間チューブを傾けて回転させて連続勾配をつくる簡単な装置であるが，複数のチューブを作製するとき簡便で再現性にすぐれている．

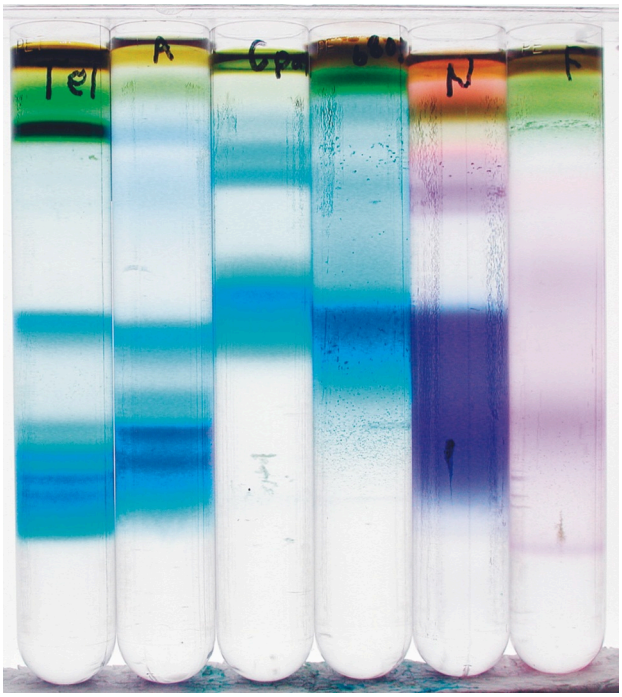


**図3**：数種のシアノバクテリアおよび灰色藻のフィコビリソームの分画例（10–50% ショ糖）．左から順に *Thermosynechococcus elongatus* BP-1, *Anabaena* sp. PCC 7120, *Cyanophora paradoxa* NIES-547, *Synechocystis* sp. PCC 6803, *Nostoc punctiforme* ATCC 29133, *Fremyella diplosiphon*. 最上部の緑色層は手順5におけるクロロフィルタンパク質の混入によるもの．

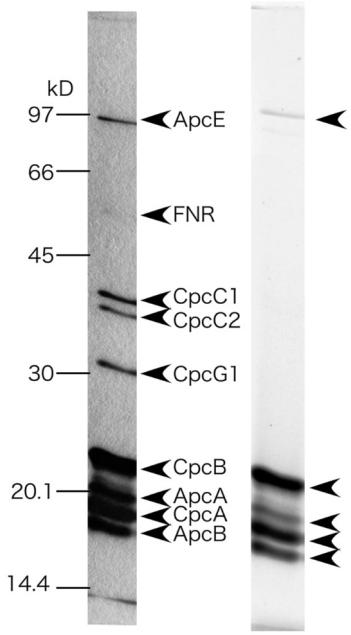



**図4**：*Synechocystis* の泳動例（15% acryl amide，Tris-Glycine 系）．左は銀染色．右は FMBIO による蛍光画像．（他の泳動条件例として低分子量リンカーに適しているのは 7.5 M urea，16–20% アクリルアミドゲルなどがある．）

る．

尿素を含まない通常の SDS-PAGE では主要なフィコシアニン，アロフィコシアニンのタンパク質がよく分離し，代表的な種では移動度の大きい方から CpcB，ApcA，CpcA，ApcB の順に分離する（図4）[7]．一方，尿素を含む SDS-PAGE（3章4eを参照）では，これらのタンパク質の分離は少し悪くなるが，コアリンカーなど低分子タンパク質や高分子のコアメンブレンリンカータンパク質すべてを分離できる．

・Zn 蛍光検出

フィコビリタンパク質は，SDS-PAGE 後に共有結合している開環テトラピロール由来の蛍光によって確認することができる．この原理は，本来ばらばらになった4個のピロール環に $Zn^{2+}$ を配位させることでテトラピロールの平面性を保ち，吸収や蛍光効率，つまり検出感度を上げることにある[8]．

1．SDS-PAGE ゲルを約 10 分間，dd$H_2O$ で洗浄する．

2．10 mM の酢酸亜鉛溶液に浸し，30 分間遮光して振盪する．ストック（1 M 水溶液，pH 調整不要）を使用する．

3．2 次元蛍光検出器で検出する．励起波長 577 nm，蛍光波長 623 nm．

＊筆者らは FMBIO II（Takara）を用いている．この場合，励起光（532 nm）は固定であるが，蛍光はチャンネル 2（605 nm 固定）で感度よく検出できる．蛍光像を図4に示す．感度は落ちるが DNA 検出用の UV 照射装置でも検出可能である．

・吸収・蛍光スペクトル測定

前述のようにフィコビリタンパク質の同定や部分複合体の会合状態の推測には分光学的な解析が有効である．特に液体窒素温度下における低温蛍光スペクトルでは色素タンパク質の蛍光ピークがシャープに得られ，近接した蛍光ピークを持つフィコビリタンパク質の同定に適している．エネルギー伝達が正常な無傷のフィコビリソームからは約 680 nm のピークが得られる（図2B）．一般に，光化学系複合体の低温蛍光は 685–695 nm 付近の系2と 720 nm 付近の系 I 由来のものに分かれるが，フィコビリソームの蛍光ピークは近接しているので注意が必要である．

## 4.e.3　低塩緩衝液によるフィコビリソームの部分解体

ロッドに結合しているリンカータンパク質は多種多様であり，これらの複合体内での局在を調べることは，フィ

コビリソーム全体の構造を理解するうえで重要である．フィコビリソームは高塩濃度の緩衝液中では安定だが，低塩濃度の緩衝液中ではその構造が不安定となり，ロッドとコアなど部分的に解体されることが知られている[4,5]．

### 4.e.3.1　ショ糖密度勾配遠心法による解体・分画

細胞破砕時から低塩濃度の緩衝液を用いても，フィコビリソームのサブ複合体を得ることは可能だが，フィコビリソーム構成タンパク質以外の混入をさけられない．そのため，3.4.e.2 で単離した intact フィコビリソームの超複合体を解体した方が解析しやすい．回収したフィコビリソーム画分を希釈してリン酸濃度を 0.3 M 以下として，超複合体を解体させショ糖密度勾配遠心法で分画する．

**[実験方法]**

1．0.8 M リン酸緩衝液（pH 7.0）をもちいて単離したフィコビリソーム画分（目安としてフィコシアニンの吸光度 $A_{630}$＝3.35 くらいのものを×mL くらい用意するとよい）を，同じリン酸緩衝液を用いてショ糖濃度が 10%以下になるように希釈する．
2．限外濾過法により，元の体積まで濃縮する．
3．30 mM リン酸緩衝液（pH 7.0）で 3 倍に希釈．緩衝液の濃度が約 0.3 M になるように調整する．
4．限外濾過法を用いて再濃縮．
5．再濃縮したフィコビリソーム溶液を 10–25%ショ糖密度勾配（0.3 M リン酸緩衝液中）に重層する．
6．遠心（130,000 xg，15 時間）．
7．色のついた画分をシリンジ等で分取する（図 5）．

### 4.e.3.2　native PAGE による解体・分画

フィコビリソームのサブ複合体は native PAGE を用いることでも分離することができる[9,10]．以下に現在当研究室で行っている例をしめす．このときに得られるのは主にフィコビリタンパク質の三量体，もしくはそれに低分子量のリンカータンパク質がついた複合体である．電気泳動条件は低塩条件であるため，フィコビリソームは解体し，ロッド由来のディスク，コア由来のディスク，コアメンブレンリンカーを含むコア複合体のバンドなどが分離される．

**【材料】**

泳動用緩衝液：Tris-glycine buffer

| | |
|---|---|
| Tris hydroxymethylaminomethane | 1.515 g |
| Glycine | 7.205 g |
| $ddH_2O$ | 1 L |

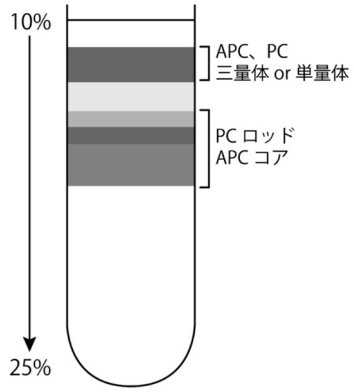



**図 5**：*Cyanophora paradoxa* の部分解体されたフィコビリソームのショ糖密度勾配遠心法による分画例．色のついた画分は，分光学的解析や SDS-PAGE をおこなうことでロッドやコアであることを特定できる．（PC，phycocyanin；APC，allophycocyanin）

**表 1**：

| | 6–12%分離ゲル | | 濃縮ゲル |
|---|---|---|---|
| | 6% | 12% | 3% |
| 60%(w/v) アクリルアミド 1.6% ビス | 0.4 mL | 0.8 mL | 0.1 mL |
| 3 M Tris/HCl pH 8.6 | 0.5 mL | 0.5 mL | — |
| 1.26 M Tris/HCl pH 6.8 | — | — | 0.2 mL |
| DW | 3.1 mL | 2.3 mL | 1.7 mL |
| 60%(w/v) ショ糖 | — | 0.4 mL | — |
| 10%(w/v) 過硫酸アンモニウム | 12 μL | 12 μL | 16 μL |
| TEMED | 2 μL | 2 μL | 3 μL |
| 合　計 | 4 mL | 4 mL | 2 mL |

アクリルアミドゲル溶液（表 1）は筆者らの処方であるが，通常の 30%アクリルアミド，0.8%ビス溶液を 2 倍量用いてもよい．

分離パターンを図 6 に示す．

## 4.e.4　フィコビリソーム／光化学系 II 超複合体の調製

フィコビリソームがどのように光化学系複合体と結合し，光エネルギーを伝達しているかを知るためには，フィコビリソームと光化学系複合体の超複合体を調製する必要がある．1980 年代にこれを目指した論文がいくつか報告されているが，もっとも有望な方法を以下に述べる．材料はやはり安定性が高い好熱性 *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 で，高イオン強度溶液と穏和な界面活性剤ジギトニンを使用する[11]．

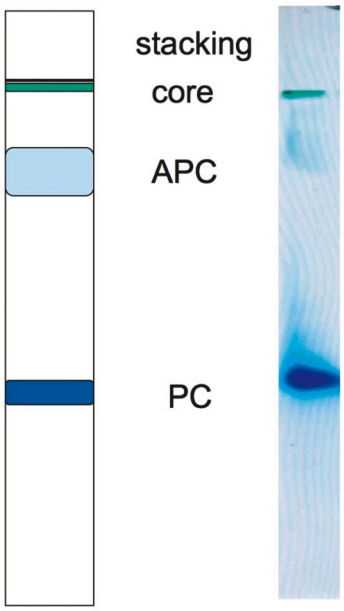



図 6：*Thermosynechococcus elongatus* のフィコビリソームの native PAGE による分離例．

［実験］*Thermosynechococcus* のチラコイド膜の調製

1．細胞を 0.15%(w/v)リゾチーム，0.5 M ショ糖，0.1 M リン酸カリウム（pH 7.2）に懸濁する．
2．40°Cで 2 時間緩やかに撹拌．この処理により細胞壁が壊れ，スフェロプラストになる．
3．スフェロプラストを遠心により回収する．
4．SPC buffer(0.5 M ショ糖，0.5 M リン酸カリウム，0.3 M クエン酸ナトリウム，0.2 mM $CaCl_2$，1.5%(w/v)牛血清アルブミン，pH 6.9）に懸濁する．
5．フレンチプレス (12,000 kg/cm²) にかけ，細胞を破砕する．
6．遠心（10,000 g，10 分間）して，非破砕の細胞を除く．上清を回収する．
7．上清に 0.1%(w/v) の DNase を加え 40 分間，20°C で処理する．
8．遠心(22,000 g，20 分間)して，上清を段階的なショ糖密度勾配（0.7，0.8，1.0，1.2 M ショ糖，SPC buffer）に重層する．

結果：遠心 (200,000 g，70 分間)．0.8 M と 1.0 M ショ糖層の間にフィコビリソームを結合したチラコイド膜の層が得られる．

［実験方法］フィコビリソーム―光化学系 II 超複合体の単離

1．フィコビリソームを結合したチラコイド膜を懸濁（0.4 mg Chl $mL^{-1}$，1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride，5 mM $MgCl_2$，0.1%(w/v)DNase，0.5% digitonin を含む SPC buffer，このとき界面活性剤とクロロフィルの濃度比(w/w) が 12.5 になる）
2．インキュベート（25°Cで 30〜60 分間）
3．遠心（25,000 g，10 分間）して，膜断片を除く．
4．上清を段階的なショ糖密度勾配（0.5，0.75，1.0，1.5 M ショ糖，SPC buffer）に重層する．
5．超遠心(300,000 g，70 分間，スイングロータ使用)．

結果：1.0 M と 1.5 M ショ糖層の間の暗緑色のバンドがフィコビリソーム―光化学系 II 超複合体である．

## 4.e.5 窒素飢餓におけるフィコビリソームの分離

フィコビリタンパク質は全細胞タンパク質の 10−20%を占めるといわれ，いわば有機窒素の貯蔵体という側面もある．したがった，培地から窒素を除くと窒素固定ができないシアノバクテリアや藻類はフィコビリタンパク質を分解する[12]．このしくみは，次に述べる補色順化とは異なり積極的な現象である．

［実験方法］

・BG11 培地から硝酸塩を除いた $BG11_0$ 培地を使用する．
・窒素飢餓の早い応答をみるためには，細胞をフィルター濾過して培地を交換する．

結果：フィコビリソームのサイズの減少は 3.4 e.2 の単離分画法によって追跡することができる（図 7）．

## 4.e.6 補色順化

ある種のシアノバクテリアのフィコビリソームには 620 nm 付近の赤色光を吸収するフィコシアニンの他に，570 nm 付近の光を吸収するフィコエリスロシアニンやフィコエリスリンといった短波長の光を吸収する集光タンパク質が含まれる．これらの種の中には，緑色光下でフィコエリスリンを蓄積し，赤色光下でフィコシアニンを蓄積するものが古くから知られており，補色適応 (Complementary chromatic adaptation) と呼ばれている[13,14]．この現象は慣例的に適応 (adaptation) と呼ばれているが，遺伝子の変化を伴わない環境応答現象であるので，以下，順化 (acclimation) と呼ぶ．補色順化は，フィコシアニンとフィコエリスリンを持つシアノバクテリアの性質としてよく知られており，パスツールのカル

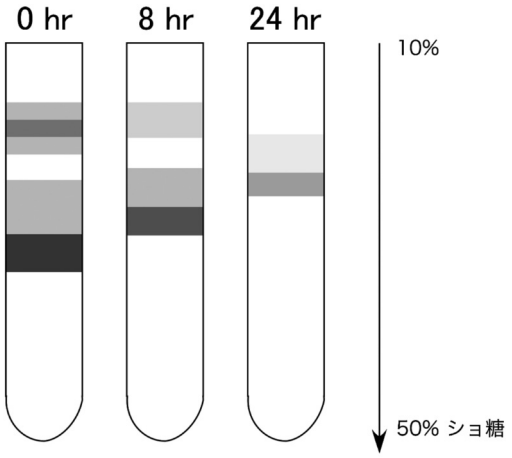



**図7**：窒素飢餓におけるフィコビリソームの分解過程における分離プロフィール．

チャーコレクションの株も補色順化によって分類されている．補色順化の主な種類として，次の3つに分けられている[13]．

Group Ⅰ：緑色光や赤色光の下でフィコエリスリンとフィコシアニンの組成を変化しない（補色順化しない）．

Group Ⅱ：緑色光の下でフィコエリスリンを増やすが，赤色光の下ではフィコシアニンを増やさない．

Group Ⅲ：緑色光の下でフィコエリスリンを増やし，赤色光の下でフィコシアニンを増やす．

これらは赤色光，緑色光を照射して培養し，その細胞の吸収スペクトルを測定することで分類が可能である．代表的な種は，Group II では *Nostoc punctiforme* ATCC 29133，Group III では *Fremyella diplosiphon* UTEX 481 であるが，PCC のリストでは株ごとに記載されている．Group II と III は，発現誘導を受ける第2のフィコシアニン遺伝子があるかどうかで区別されるといわれているが，近年の遺伝子の研究によれば第2のフィコシアニン遺伝子がなくてもリンカータンパク質の発現制御によってフィコシアニンの蓄積制御が起こる可能性があり，この分類はそれほど絶対的ではないかもしれない．

**[実験方法]**

培養の際には以下の点に注意する必要がある．

①緑色光に 530～540 nm，赤色光には 630～640 nm 付近の波長の光を用いる．

②約 10 $\mu$E $m^{-2}sec^{-1}$ の弱光で細胞を培養する．

③濃度の薄い細胞を2週間程度かけて培養する．

重要なポイントは，それぞれの光条件を弱光にすることである．フィコシアニン励起の赤色光であっても，その光強度が 30-40 $\mu$E $m^{-2}sec^{-1}$ より強いと，むしろフィコシアニン含量が低下する強光応答が起こる．また，一度合成されたフィコシアニンやフィコエリスリンはあまり分解しないので，弱光でできるだけ長期間培養し，培養開始時の細胞の持ち込みをできるだけ少なくすることが重要である．光源は白色光とカットフィルターやセロハン等を組み合わせてもよい．

また色付きの蛍光灯や LED 光源を利用してもよい．また，680 nm 付近の赤色光によってクロロフィルを励起すると，系Ⅰ／系Ⅱ比の調節が起こる可能性もあるので，注意する．

## 文献

1）三室守，村上明男，菊池浩人，*蛋白質・核酸・酵素* **42**（1997）P.2613.
2）R. MacColl, *J. Struct. Biol*. **124** (1998) P.311.
3）K. Koyama, T. Tsuchiya, S. Akimoto, M. Yokono, H. Miyashita & M. Mimuro, *FEBS Lett*. **580** (2006) P.3457.
4）A. N. Glazer, *Methods Enzymol*. **167** (1988) P.291.
5）E. Gantt, C. A. Lipschultz, J. Grabowski & B. K. Zimmerman, *Plant Physiol*. **63** (1979) P.615.
6）G. Ajlani, C. Vernotte, L. Dimagno & R. Haselkorn, *Biochim. Biophys. Acta* **1231** (1995) P.189.
7）K. Kondo, X. X. Geng, M. Katayama, & M. Ikeuchi, *Photosynth. Res*. **84** (2005) P.269.
8）T. R. Berkelman, & J. C. Lagarias, *Anal. Biochem*. **156** (1986) P.194.
9）W. Reuter & W. Wehrmeyer, *Arch. Microbiol*. **150** (1988) P.534.
10）L. Sun & S. M. Wang, *J. Photochem. Photobiol. B*. **72** (2003) P.45.
11）M. Kura-Hotta, K. Satoh, & S. Katoh, *Arch. Biochem. Biophys*. **249** (1986) P.1.
12）A. R. Grossman, M. R. Schaefer, G. G. Chiang, & J. L. Collier, *Microbiol. Rev*. **57** (1993) P.725.
13）N. Tandeau de Marsac, *J. Bacteriol*. **130** (1977) P.82.
14）D. M. Kehoe & A. Gutu, *Annu. Rev. Plant Biol*. **57** (2006) P.127.

# 4．タンパク質複合体の単離
## f．小型サブユニット

岩井　雅子[1)]，池内　昌彦[2)]

チラコイド膜に存在する光合成装置には多数の疎水性小型サブユニットが結合している．これらのタンパク質の分析法は一般のタンパク質実験法と異なるので，その分析法と問題点を概説する．

## Low-molecular-mass subunits of photosynthetic apparatus

Masako Iwai, Masahiko Ikeuchi

Low-molecular-mass subunits are unique components of photosynthetic apparatus harboring photosystems and cytochrome b6/f complex in the thylakoid membranes.　We summarized technical points for handling of these low-molecular-mass subunits including detailed protocol of SDS-urea-PAGE.

### 4.f.1　背景

光化学系IIや光化学系I複合体，シトクロム $b_6/f$ 複合体には多数の小型サブユニットが結合している．これらのほとんどはチラコイド膜を貫通する $\alpha$ ヘリックスをもち，それぞれの反応中心を周辺から取り囲むように存在している．これらには進化的にシアノバクテリアから高等植物まで広く保存されているものが多い．その中には，複合体の会合や安定化，ステート遷移や電子伝達など特定の役割が提唱されているものもあるが，近年の結晶構造解析の結果と合致しないものもある．これらの小型サブユニットの構造や機能，生理的役割についてはさらに詳しく調べる必要があるが，疎水性の低分子タンパク質に固有の技術的問題も多い．本項では，これらの小型サブユニットの分離・同定に使われるSDS-PAGE法や抗体，アミノ酸配列の決定，質量分析法などさまざまな手法とその問題点について解説する．

### 4.f.2　SDS-urea-PAGE法

SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動法（SDS-PAGE）はタンパク質の分離法としては非常に有効であり，なかでも濃縮ゲルをとり入れたLaemmliの方法[1)]は広く利用されている．一般に，低分子のタンパク質を分離するには，高濃度のアクリルアミドが適しているが，光合成系に存在する疎水性の分子質量10 kDa以下の小型サブユニットを分離するには，それだけでは不十分である．そのおもな理由は，低分子の疎水性タンパク質がSDSと脂質の混合ミセルの泳動と競合すること，また脂質を除いてもそもそもシャープなバンドを形成できないことにある．この問題点を解決したのは筆者らのSDS-urea-PAGE法[2)]とShäggerらのTris-Tricine法[3)]など特殊な電気泳動法である．これらは，3章6fで詳しく述べられているが，ここでは，筆者らの方法を，コツなどを交えて紹介する．

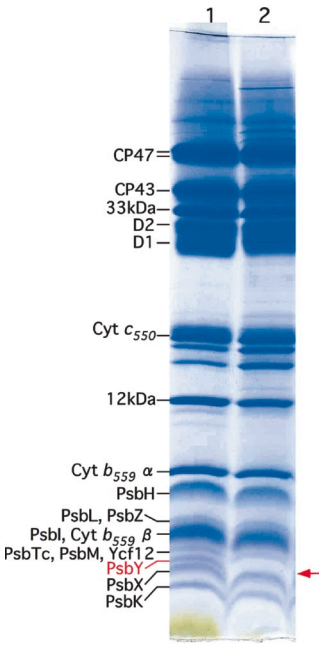



図1：SDS-urea-PAGEによる光化学系II複合体の分離例．泳動先端部のクロロフィルを含む部分はSDSと脂質の混合ミセルに相当する．lane 1：*Thermosynechococcus elongatus* 野生株の系II，lane 2：同 *psbY* 破壊株の系II．赤い矢印は，破壊によって消失したPsbYのバンド位置．

1）東京理科大学理工学部応用生物科学科
2）東京大学大学院総合文化研究科広域科学専攻生命環境科学系

SDS-urea-PAGE 法のポイントは，高濃度の尿素を用いることで，SDS と脂質の混合ミセルの移動度を大きくすること，またタンパク質に弱く結合した SDS を解離してくっきりとしたバンドとして分離することにある．また，この方法は Tris-Tricine 法と比べて，幅広い分子量のタンパク質を分離できることや安価な試薬だけでできる点ですぐれている．一方，室温が 20°C以下では尿素が析出するため泳動できないことは欠点である．

**[実験方法]**

準備

・通常サイズのスラブ泳動用ガラス板（16 cm×16 cm，スペーサー 1 mm）を用意する．
・連通管型グラジエント作製器の両筒をつなぐチューブをスクリューコックで閉じておく．
・ペリスタポンプ：流速を 1〜1.5 mL $min^{-1}$ に設定しておく．
・重合の予備実験が必要である．流速 1.5 mL $sec^{-1}$ の場合でも，18 mL を流し込むには，10 分以上要する．この間にアクリルアミドが重合しないように，しかも，30 分後には重合するように過硫酸アンモニウム溶液（重合開始剤）と TEMED（重合促進剤）の量を調節する必要がある．これらを多めに入れるときは，重合開始剤などを加える前に，アクリルアミド混合液を氷上で 1 分ほど冷却して重合しにくくするとよい．

ゲル作製

1．16–22%濃度勾配用の溶液を，表 1 に基づいて調製する．なお，過硫酸アンモニウムと TEMED 以外を混合して，少し暖めるなどして尿素を完全に溶解する．その後，すべての準備ができてから，過硫酸アンモニウムと TEMED を加え，よく混合する．
　＊筆者らは，50 mL 容量の大きいガラス試験管で混合液を調製している．尿素は周りから溶解熱を奪うため，高濃度の溶液をつくりにくい．必要に応じて，湯浴もしくは湯沸かし器のぬるま湯で少し暖める．しかし，溶液の温度が高くなると，グラジエント作製中にアクリルアミドが重合してしまうおそれがある．尿素の溶解後は，水道水に浸すなどして室温付近まで冷ます．これらの作業には試験管が便利であり，またボルテックスもできる．
2．グラジエント作製用連通管にこれらの溶液を入れる．重い 22%溶液を入れる側の管（ペリスタポンプにつながれている側）には小さなマグネット（体積は約 0.5〜1 mL）を入れ，スターラーで混合する．同様のマグネットを軽い側の管にも入れてもよい．
　＊混合する 2 つの溶液の比重が大きくちがうので，等量の溶液を連通管に入れ，両管をつなぐチューブを開くと，重い側の液が軽い側へ逆に流れ込んでしまう．また，マグネットを重い側にだけ入れると，さらに逆流が促進される．この逆流を避けるコツは，2 つの溶液を入れた後，ペリスタポンプで約 1 mL ほど流した後で，両管をつなぐとよい．実際には，両管をつなぐ細いチューブをスクリューコックなどで閉じておき，液を少し流してから，コックを開き，チューブ内の気泡を押し出すのが簡便である．軽い側の管の上部を手のひらで軽く押せば，チューブ内の気泡を押し出し，軽い側の液を重い側の管に流し込むことができ，その後の混合がスムーズに進む．
3．ペリスタポンプによってグラジエントを作製．流速約 1〜1.5 mL $min^{-1}$．
4．適当な位置で送液を止める（ガラス板の上端から約 2.6 cm くらいが目安）．
5．水もしくはブタノールを重層して，空気を遮断する．
6．室温で 1 時間以上放置して十分に重合させる．
7．重層した水またはブタノールを除き，洗浄後，濃縮ゲル混合液を流し込み，手早くコウムを挿入する．
8．30 min 以上放置して重合を完了．

保存溶液作製の注意

・分離ゲルの pH が重要である．分離ゲル用緩衝液の調製では，3 M Tris 溶液に濃塩酸を加えて，pH を調整するが，このとき発熱する．Tris は緩衝液の中でもとくに pH の温度依存性が高い．したがって，濃塩酸を加

**表 1：**

| | 分離ゲル | | 濃縮ゲル |
|---|---|---|---|
| | 16% | 22% | |
| 60%アクリルアミド溶液A | 2.4 mL | 3.3 mL | − |
| 60%アクリルアミド溶液B | − | − | 0.4 mL |
| 分離ゲル用緩衝液 | 1.8 mL | 1.8 mL | − |
| 濃縮ゲル用緩衝液 | − | − | 0.4 mL |
| 尿素 | 4.05 g | 4.05 g | 1.8 g |
| $H_2O$ | 1.8 mL | − | 1.85 mL |
| 60%(w/v)ショ糖 | − | 0.9 mL | − |
| 10%(w/v)SDS | 90 μL | 90 μL | 40 μL |
| 10%過硫酸アンモニウム | 30 μL | 20 μL | 28.5 μL |
| TEMED | 4.3 μL | 4.3 μL | 4.5 μL |

A：60%(w/v) アクリルアミドモノマー，0.8%(w/v) ビスアクリルアミド
A：60%(w/v) アクリルアミドモノマー，1.6%(w/v) ビスアクリルアミド
分離ゲル用緩衝液：3 M Tris-HCl(pH 8.6)
濃縮ゲル用緩衝液：1.26 M Tris-HCl(pH 6.8)

えて，見かけのpHが8.6になっても，しばらく放置して冷ますと，pHは8.7〜8.8に上昇する．そのため，もう一度濃塩酸を加えてpHを調整する必要がある．なお，分離ゲル用緩衝液のpHが8.8以上では，低分子量域は拡がるが，バンドはぼけて役に立たない．pHが8.4以下ではバンドはシャープになるが，低分子量域は圧縮されてしまうので，いい分離は期待できない．したがって，不満足な結果の場合は，分離ゲル用緩衝液のpHを再度確認した方がよい．

・アクリルアミド溶液：室温で遮光して保存する．濃度が高いので，4 ℃では沈澱を生じる．アクリルアミド溶液Aはビスの量が半分になっている．これは溶液Bでも代用できるが，分離は溶液Aの方が少しよい．
・過硫酸アンモニウム溶液：溶液を1ヶ月くらいは−20℃で保存できる．重合条件が微妙なので，同じ溶液を用いて，最適条件を固定することがもっとも重要である．

電気泳動における注意

・泳動するサンプルは約3 $\mu$g Chlになるよう調整する．サンプル量が多すぎると，持ち込みの脂質が過剰になり，SDSと脂質の混合ミセルの泳動位置が先端から遅れて，低分子タンパク質の泳動を妨害する．
・濃縮ゲルにも7.5 M尿素が含まれており，上部電極液を入れた後，サンプルをロードするまでに，周りのゲルから尿素が溶けだし，ウェルの底には高濃度の尿素が蓄積する．そのため，サンプル溶液に十分な重さがないと，ロードしたサンプルが浮き上がってくる．対策としては，60%(w/v)ショ糖溶液をサンプル溶液に少量添加するとともに，ロードの直前にウェルの底の尿素を含む液をシリンジで除去する．

染色液：0.04%クーマシーブリリアントブルーR-250（CBB），50%メタノール，10%酢酸で，室温で1時間以上，ゆっくり振盪しながら行う．筆者らはCBBストック液(最終0.08%　CBB，100%メタノール)を用意して，使用直前にCBBストック液100 mL，酢酸20 mL（最終10%），$H_2O$ 80 mL（合計200 mL）を混合し，すぐに使用している．CBBの浸透性は悪いので，染色時間が短いとゲル内部のタンパク質は十分には染色されない．これはゲルを切ってみるとよく分かる．なお，CBBは製品によって純度や不純物にちがいがあり，染色性が異なることがある．筆者らはBio-Rad社のものを使用しているが，この色素は不純物はそれほど多くなく，不溶物を濾過除去する必要はない．しかし，水などと混合後は長く放置するとCBBが凝集して不溶物をつくりゲル表面を汚す．なお，この汚れはメタノールで洗い落とすこともできる．一度使用した染色液にはゲル中のSDSが溶けだしており，CBBの染色性を抑制するので，再利用はしない．CBBストック液は安定であるが，メタノールと酢酸を混合すると，エステル生成が起こるので，エステル臭が強くなった染色液は未使用でも使用しない．

脱色：短時間の脱色は，25%メタノール，10%酢酸の水溶液で行う．また，overnightや長期間の脱色もしくは放置するときは，10%酢酸に浸し，キムワイプやクリネックスなどのセルロースパルプを折りたたんで同じ容器に入れておく．これらのセルロースパルプは溶液中のCBBの凝集物をトラップしてゲル表面の汚染を軽減してくれる（メタノール濃度は15%以下のときに限る）．

### 4.f.3　Western blotting法

筆者らは合成ペプチドや大腸菌で発現させた融合タンパク質に対する特異抗体の作製を試みた．いくつかの小型サブユニット（PsbI，PsbTc，PsbKなど）に対するウサギの抗体は抗体価は高くないがWestern blottingに使用できた[4]．一方，PsbMに対する抗体は免疫用の抗原とは反応したが，チラコイド膜中のPsbMタンパク質を実用レベルで検出できなかった[5]．小型サブユニットの膜表在性領域は限定されており，エピトープとして十分でなかったと考えられ，さらに検討が必要である．

### 4.f.4　エドマン分解法

N末端アミノ酸配列の決定はタンパク質同定の鍵である．SDS-urea-PAGEで展開したバンドをPVDF膜（polyvinylidene difluoride）にブロットし，プロテインシーケンサーでN末端アミノ酸配列を決定する．この方法は，アミノ酸配列として確実にタンパク質を同定できるが，プロテインシーケンサーの検出感度が低いことが欠点である．小型サブユニットのうちでもPsbJタンパク質は，ほとんど検出できない．その理由は明らかではないが，SDS-urea-PAGEでも分離されるバンドが幅広くなって，検出感度に到達していないためかもしれない．

PVDF膜（0.2 $\mu$m孔径，ミリポア社のイモビロンPSQグレードなどがある）に電気的にブロットし，アミドブラック10 Bで染色し，目的のバンドを切り出す．ブロット装置はセミドライ型が効率がよい．染色液の組成

は，0.1% アミドブラック 10 B，50%メタノール，10% 酢酸で，染色時間は 1-2 分間で十分である．脱色は $ddH_2O$ のみでよい．CBB も染色剤として使用できるが，バックグランドが強く染色されるので，脱色作業をていねいに行う必要がある．プロテインシーケンサーには，感度に定評がある Procise システム（アプライドバイオシステムズ）があるが，メンテナンスが面倒である．一方，島津のシーケンサー（モデル PPSQ-20 など）は HPLC システムの溶離液としてアセトニトリル溶液を再利用することができ，運転費用が安く，個人でもある程度メンテナンスが可能であるが，感度はやや落ちる．

いくつかの小型タンパク質のN末端はホルミル化されており，エドマン分解を受けないが，0.6 N HCl 処理によって除去することができる．切り出した PVDF 膜のバンドをエッペンチューブに入れ，0.6 N HCl 溶液に浸し，12〜24 時間ほどインキュベートする．なお，PVDF 膜の表面は非常に疎水的で，一度乾燥すると水溶液（希塩酸も同様）はほとんどはじかれる．しかし，塩酸は揮発性なので，PVDF 膜を入れたチューブをボルテックスなどでよく混合しつづければ，十分な結果が得られる．

SDS-urea-PAGE の分離能はかなり高いが，切り出した 1 本のバンドをシーケンサーで分析しても，複数のアミノ酸シグナルが得られることも多い．異なる小型サブユニットが微妙にオーバーラップして泳動されるためである．既知の配列に相当するシグナルを差し引くか，近接したバンドも分析して，それらのシグナル強度を比較することで，特定のタンパク質の配列を知ることができる．また，各アミノ酸のシグナル強度から，その存在量をおおまかに推定することもできる．しかし，タンパク質によってブロット効率は異なり，エドマン分解での切出効率や HPLC でのピークの形状などはアミノ酸残基の種類によって異なるので，単純にアミノ酸ピークの高さだけで存在量を推定するのは危険である．異なるタンパク質の同じアミノ酸残基のピーク高を比較したり，異なる標品での同じタンパク質の同じアミノ酸残基のピーク高を相互に比較することで，それらの存在量の変化も議論できる．

## 4.f.5　質量分析法

質量分析法は感度が非常に高く，脱ホルミル化のような前処理を必要としないなど便利な点が多いが，アミノ酸配列を直接決定するのではなく，分子質量と合致する配列を推定しているだけであり，ゲノム情報が必須である．また，SDS-PAGE のバンドを抽出して分析するだけでなく，細胞や光化学系複合体などをそのまま網羅的に分析できることも大きな利点である．しかし，疎水性ペプチドや低分子タンパク質の分析は不得手であり，膜貫通性の小型サブユニットの検出はほとんど報告されていない．筆者らは，シアノバクテリア *Synechocystis* 全タンパク質の網羅的な解析を行い，全遺伝子の約 45%の産物を質量分析で検出した[6]．しかし，系 II に絞ると，検出できたのは PsbA PsbB PsbC PsbD PsbE psbO PsbU PsbV PsbZ だけで，ほとんどの小型サブユニットは検出されていない．しかし，近年の分析法の進歩により，光化学系 II 複合体を出発標品とすれば，ほとんどの小型サブユニットも検出できるようになってきた[7]．このため，SDS-PAGE で予想外の位置に泳動されるタンパク質でも同定できるメリットもある．筆者らの具体例としては，PsbTc の C 末領域にカセットを導入して本来のバンドが消滅したので遺伝子破壊できたつもりであったが，質量分析によって C 末の truncation であることが判明したことがある[8]．質量分析の欠点としては，シグナル強度がペプチド鎖の配列や特性に大きく依存するため，異なるタンパク質の量比を議論することはほとんどできない．この欠点も，異なる同位体でラベルした標品を同時に質量分析することで，標品間のタンパク質の変動を追跡することが可能になったが，まだ小型サブユニットの分析に適用された報告はない．

## 4.f.6　遺伝子操作法

これまでに多数のタンパク質が光化学系複合体などに結合していることが報告されている．上述したエドマン分解法でも質量分析法でも，検出できたタンパク質がすべてその複合体に特異的に結合しているのかそれとも非特異的なものか，判断できないものも多い．そのためには，これらのタンパク質の遺伝子を操作してその影響を調べることや，タグを導入してマイルドな条件でタンパク質（複合体）を単離すること[9]，抗体の代わりにタグを検出するなどさまざまな遺伝子工学的アプローチを組み合わせることが重要になってきている．

通常の遺伝子破壊の手法を小型サブユニットに応用する場合は，標的 ORF のサイズが小さいため，制限酵素の認識部位が限定される．小型サブユニットの遺伝子破壊では，わずかな残基の有無でも本来の破壊株の表現型に影響が出るので，とくに注意が必要であることは，4.f.5 の PsbTc でも述べた[8]．多くの小型サブユニットは膜貫通性という意味では「膜内在性」といえるが，光化学系複合体において周辺部に結合するという意味では「外在

性 peripheral」といえる．外在性のサブユニットは複合体に強く結合していないことが多い．このような小型サブユニットの性質を調べるには，4.f.1〜5 の生化学的解析と本項の遺伝子操作の組合せが必要で，そのような材料としては好熱性シアノバクテリアが適していると考えられる．好熱性シアノバクテリアの形質転換法については，5.1 a を参照されたい．

最近の系 II 複合体の結晶構造を決定した論文（Guskov et al. Nature Struct. Mol. Biol. 16 (2009) P.334）では，PsbJ のN末端はアセチル化されていると推定している．アセチル化されたポリペプチドの配列はエドマン分解では決定できない．したがって，アセチル化が PsbJ タンパク質がこれまで検出されなかった理由かもしれない．なお，その根拠としては，MALDI-TOF 型の質量分析によって求めた分子質量 4017 Da がアセチル化された PsbJ と一致する．しかし，エドマン分解でシグナルが得られる PsbF もアセチル化を仮定するなど，質量分析法にもまだ問題があるようである．

## 文献


1）U. K. Laemmli, *Nature* **227** (1970) P.680.
2）H. Schägger & G. von Jagow, *Anal. Biochem*. **166** (1987) P.368.
3）M. Ikeuchi, & Y. Inoue, *Plant Cell Physiol*. **29** (1988) P. 1233.
4）M. Ikeuchi, & Y. Inoue, *FEBS Lett*. **241** (1988) P.99.
5）青山智佳，修士論文，(2003)．
6）Y. Ishino, H. Okada, M. Ikeuchi, & H. Taniguchi, *Proteomics* **7** (2007) P.4053.
7）M. M. Nowaczyk, 私信．
8）T. Henmi, M. Iwai, M. Ikeuchi, K. Kawakami, J. R. Shen, & N. Kamiya, *J. Synchrotron Radiat*. **15** (2008) P. 304.
9）H. Fey, D. Piano, R. Horn, D. Fischer, M. Schmidt, S. Ruf, W. P. Schroder, R. Bock, & C. Buchel, *Biochim. Biophys. Acta* **1777** (2008) P.1501.

# 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$\beta$-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$\beta$-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，

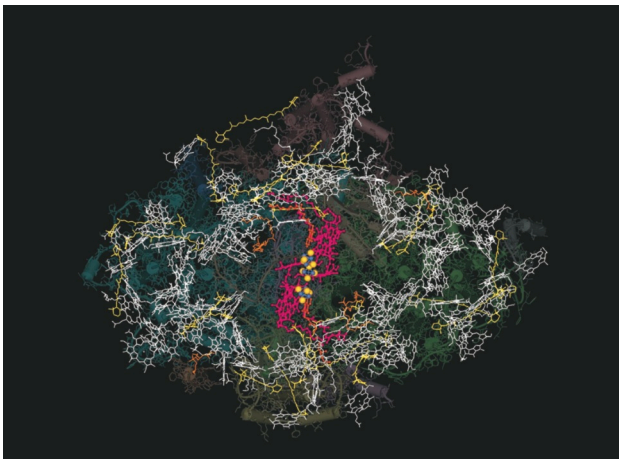


図1：（II_Fig1. jpg）
好熱性シアノバクテリア*Thermosynechococcus elongatus*の光化学系Ⅰ反応中心複合体の結晶構造図[1)]．光化学系Ⅰ複合体は12個のポリペプチド，95分子のクロロフィル*a*（周辺部のアンテナクロロフィル*a*を白色，中心部のコアクロロフィル*a*を赤色で示す），1分子のクロロフィル*a*エピマー，22分子の$\beta$-カロテン（黄色），3組の4Fe-4Sクラスター，2分子のフィロキノン（ビタミンK1）（赤橙色），4分子の脂質（3分子のホスファチジルグリセロール，1分子のモノガラクトシルジアシルグリセロール）（茶色）が有機的に組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 $\beta$-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げて再度，遠心し，5.5 以上のときの上清を用いる．

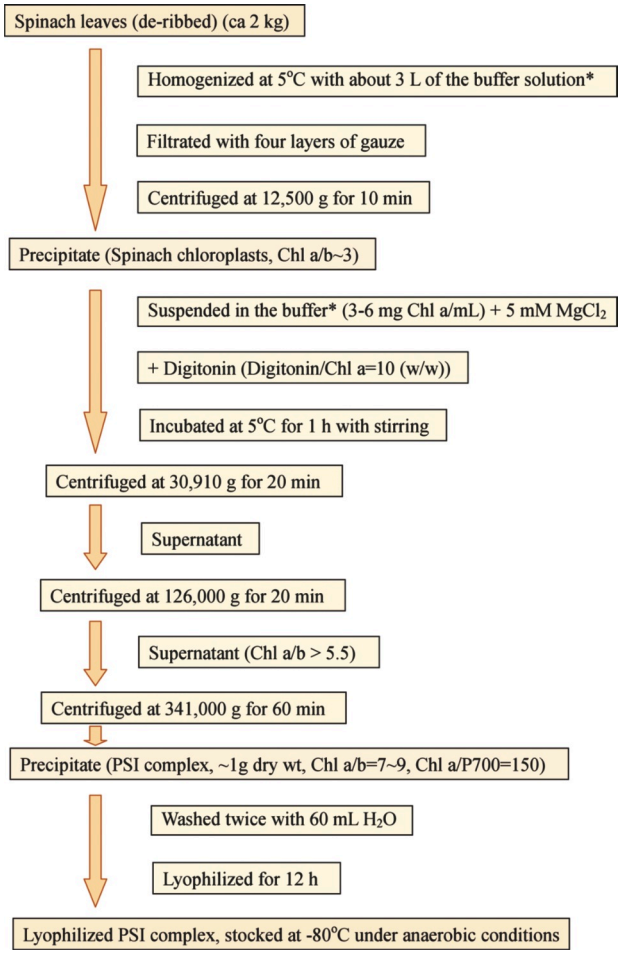



**図 2**：ホウレンソウ葉からジギトニン処理による光化学系 I 複合体の調製法

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かえす）．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°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．

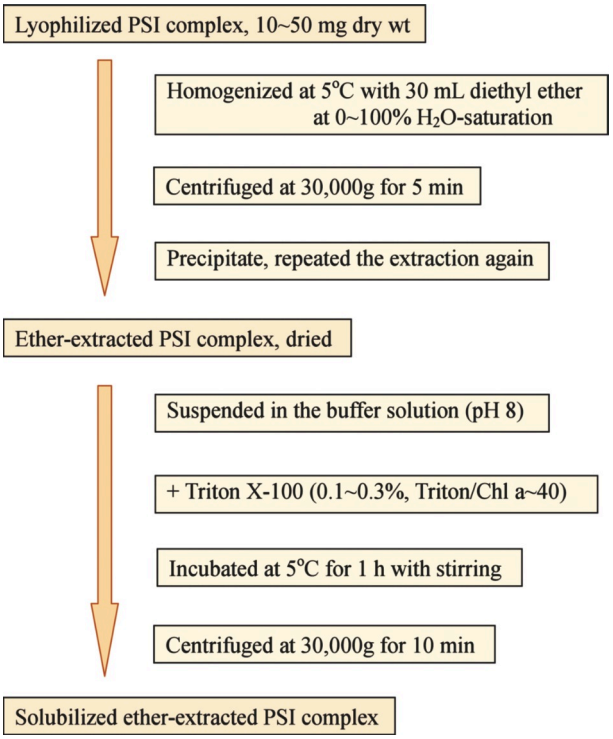



図3：光化学系Ⅰ複合体のエーテル処理法

**【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　*xmL*＋0%（dry）エーテル*ymL*）

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．湿度が高いと，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変化するので，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）．アルカリ性にするほどより可溶化する．

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（*Heliobacterium 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-satureted) 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, $A_0$）および FeS クラスター（Fx, $F_A/F_B$）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]．

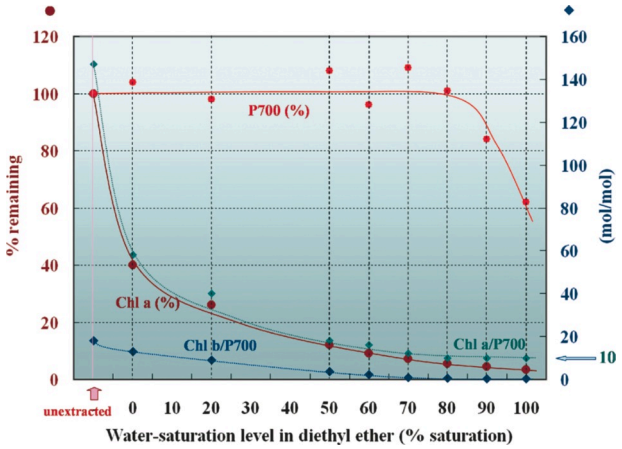



**図 4**：(II_Fig4. jpg)
ジエチルエーテルの水飽和度を変えたときの *Chl a*，*Chl b* および P700 の量変化．赤丸，左目盛りは，処理前の量を 100%としたときの各処理後の標品に残っている *Chl a* および P700 の%量．ひし形，右目盛りは各標品の *Chl a*/P700，*Chl b*/P700 のモル比（mol/mol）．

**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 *a*, *b* | Selectively extracted |
| Carotenoids | Fully extracted |
| Lipids | Almost fully extracted |
| Polypeptides | Not extracted |
| Electron carriers | |
| P700 (Chl *a* dimer) | Not extracted |
| A (Accessory Chl *a*) | Not extracted |
| $A_0$ (Chl *a* 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 $A_0$ 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. *Amesz*, 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. *Yohihara*, 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.

# 5．色素の分析
## a．クロロフィルおよびクロロフィル代謝経路中間体の抽出・定量法

田中　亮一[1)]

植物および藻類からのクロロフィルとその代謝中間体の抽出・定量法について解説する．特に，有機溶媒による色素の抽出方法と吸光光度計およびHPLCを用いてこれらの色素を定量する方法について，具体的な手順と注意点を詳述する．

## Analysis of chlorophyll and its metabolic intermediates

Ryouichi Tanaka

Methods for the analysis of chlorophyll and its metabolic intermediates are presented.　In particular, the HPLC method developed by Zapata et al. ［Marine Ecology-Progress Series 195 (2000) p.29］and its application to the analysis of various intermediate molecules of chlorophyll metabolism are described in detail.

### 5.a.1　はじめに

クロロフィルは，図1に示したクロリン環をもつテトラピロール化合物である．chlorophyll *a, b, c, d* などの種類が知られている（図1参照：例外的にchlorophyll *c1, c2, c3* はクロリン環の代わりにポルフィリン環を持つ）．陸上植物は，このうち，chlorophyll *a* およびchlorophyll *b* を合成する．我々にとって最もなじみ深く，研究対象となる頻度が高いのがこの2つの色素であろう．従って，本稿では，まず，chlorophyll *a* およびchlorophyll *b* の抽出・定量法を解説する（2章）．初めて光合成色素を扱う読者を想定して，できるかぎり，詳細な手順を記述した．

3章では，さまざまな代謝中間体の定量法について述べた．4章では，HPLCを用いて，chlorophyll *a, b* だけでなく，その他のクロロフィルとその代謝中間体を定量する方法について述べている．4章でも，2章と同様に，色素の抽出についての注意事項を記載しているが，

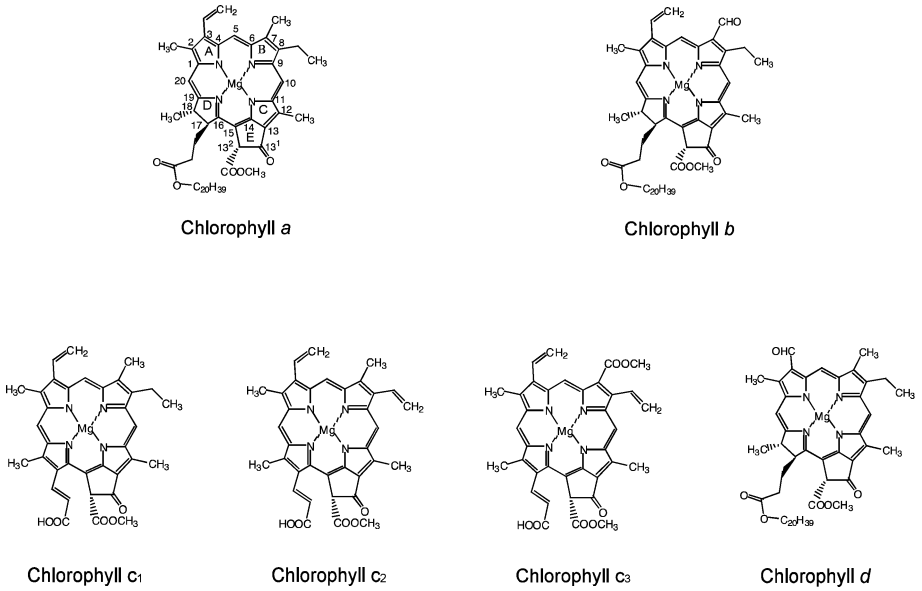



図1：クロロフィル類の構造
Chlorophyll *a* の構造式上に，IUPACの命名法に基づいた炭素原子の位置番号とピロール環の名前を示した．

1）北海道大学・低温科学研究所

4章では，HPLCでの色素の分離を想定した色素の抽出方法を述べており，いくつか記載の異なる箇所があるので注意していただきたい．基本的に，ほとんどのクロロフィルとその代謝中間体の定量の際には，まず，HPLCによる色素の分離が必要になる．続いて，クロロフィル類は吸光光度計で，主要な代謝中間体は蛍光光度計を用いて定量する．筆者らの研究室では，Zapataら[1]の開発した方法を一部改変して用いている．本稿では，主に被子植物のクロロフィルと代謝中間体の分離と定量を例にとって解説するが，基本的に，これ以外の生物のクロロフィルも同様の方法で分離,定量することが可能である．

## 5.a.2 chlorophyll *a* およびchlorophyll *b* の抽出と定量

### 5.a.2.1 chlorophyll *a* およびchlorophyll *b* の抽出

陸上植物からのchlorophyll *a* およびchlorophyll *b* の抽出には，acetoneを用いる．Methanol, *N',N''*-dimethylformamideなどを用いることも可能[2]である．methanolは，クロロフィル類を化学修飾しやすい，また，抽出液中での光合成色素の消失を招きやすいとされているが[3]，methanolを用いた抽出方法もいくつか報告されている[2,4]．Porraらは，20%(v/v)の2.5 mMリン酸バッファー(pH 7.8)を加えた80% acetoneで色素を抽出する方法も紹介している．[2]

被子植物の葉の場合，まず，乳鉢に葉と適量のacetone[注1]を加えて，すりつぶす．葉がやわらかく，量が少ない場合は，乳鉢の代わりにガラス製のホモジナイザーなども便利である(図2 A)．また，試料の数が多い場合は，ShakeMaster(バイオメディカルサイエンス)などの多検体用破砕機を使うことができる(図2 B)．ShakeMasterを使用する場合，試料をステンレスビーズ，acetoneとともに2 mlの丸底のマイクロチューブに入れ，さらに付属のアルミ製容器(図2 C)に入れて，1分ほど震盪する．

[注1] Chlorophyll *a* の80% acetone中におけるモル吸光係数(663.6 nm: L mmol$^{-1}$cm$^{-1}$)は76.8である2) R. Porra, W. Thompson and P. Kriedemann. Biochim Biophys Acta **975** (1989) p.384.．ある生物の1 gあたりのクロロフィル量を大雑把に1 $\mu$molと見積もれば，試料10 mgから1 mlの80% acetoneでchlorophyll *a* を抽出すると，663.6 nmの吸光度は，0.01 $\mu$mol x 76.8=0.768となる計算である．つまり，大体1 mgから10 mg程度の試料から1 mlの80% acetoneでクロロフィルを抽出すれば，吸光度は0.08〜0.80程度におさまる，ということになる．文献等から，試料中のクロロフィル量が予測し，抽出に用いる溶媒の量を決めるとよい．

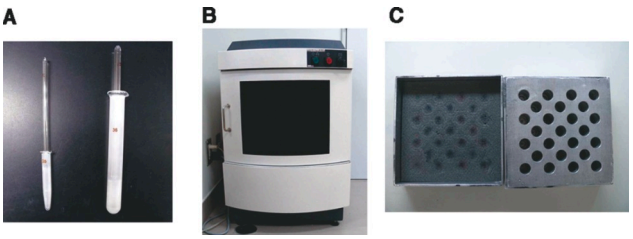



**図2**：ガラス製ホモジナイザーと多検体用破砕機
1．ガラス製ホモジナイザー，2．多検体用破砕機ShakeMaster，3.ShakeMaster付属のアルミ製容器(破砕中にチューブのふたが開かないように，筆者は固めのスポンジをふたの裏に貼付けている．)

上記の方法で，組織が十分につぶし，撹拌した後，懸濁液を植物組織ごと遠心チューブに移す．約10,000 x gで5分程度遠心し，上清を別なチューブに移す．再度，acetoneを組織に加え，組織から完全に緑色が抜けるまで，撹拌と遠心を繰り返す．上清を一本のチューブに集め，上清の量を量っておく．なお，クロロフィル類は光，高温，酸素に弱い．極力，光を避けるにこしたことはない．しかし，よほど正確な定量が必要な場合，また，微量な試料を扱っている場合を除いて，通常の実験室の照明下で抽出操作を行っても構わない．ほとんどの場合，急激にクロロフィルが分解することはない．

### 5.a.2.2 吸光光度計によるchlorophyll *a* およびchlorophyll *b* の定量

上述の抽出液に，最終的にアセトン濃度が80%になるように水または2.5 mMリン酸バッファー(pH 7.8)を加える．植物の生葉は，およそ90%程度の水分を含んでいるので，大量の試料を用いた場合は，試料からの持ち込みの水分も計算に入れるとより正確である．

吸光光度計で測定する際には，スクリューキャップ付きの石英またはガラスのキュベットを使うとよい．測定中の有機溶媒の蒸発を防ぐことができる．

chlorophyll *a* およびchlorophyll *b* のモル吸光係数は，いくつかの研究室から報告されているが[2,5,6]，この中で，原子吸光法により，クロロフィルの定量をおこない，モル吸光係数を求めたPorraらの係数[2]が最も信頼性が高いと言われている．663.6 nm(chlorophyll *a* の吸収極大波長)および646.6 nm(chlorophyll *b* の吸収極大波長)を測定し，以下の式によって，80%アセトン中におけるchlorophyll *a* (式1)，およびchlorophyll *b* (式2)の濃度を求める．このとき，750 nmにおける吸光度をバックグラウンドとして，663.6 nmおよび646.6 nmから差し引いておく．

$$\text{Chlorophyll a}(\mu g/ml) = 12.25 \times A^{663.6} - 2.85 \times A^{646.6} \quad (式1)$$

$$\text{Chlorophyll b}(\mu g/ml) = 20.31 \times A^{646.6} - 4.91 \times A^{663.6} \quad (式2)$$

chlorophyll *a* と chlorophyll *b* の分子量はそれぞれ 893.48 と 907.46 であるので，モル濃度が必要な場合は，この数値を用いて換算する．

## 5.a.3 クロロフィル代謝中間体の種類と性質

クロロフィル代謝は，厳密に考えると，代謝経路がヘムと分岐する Mg-protoporphyrin IX から始まると言えるが(図 3)，実際の研究でクロロフィル代謝を扱う際は，グルタミン酸から始まるテトラピロール化合物に共通の代謝経路まで含めて調べることが多い．そこで，本稿では，クロロフィルとヘムの共通の代謝経路（図 3 参照：グルタミン酸から protoporphyrin IX まで）も含めて解説する．

この章では，まず，クロロフィル（ヘム）代謝経路を概観し，代謝中間体の特徴について解説する．また，本稿では詳しく紹介していない代謝中間体の定量法について，随時，引用文献を挙げた．

**グルタミン酸から 5-アミノレブリン酸(ALA)**　テトラピロール合成経路の出発物質はグルタミン酸またはグルタミル-tRNA である．(一部の光合成生物には例外もある[7]．)図 3 を見れば明らかなように，ALA までの中間体は，ピロール構造を持たないので，これ以降の物質とは検出方法が異なる．ALA を検出するためには，ethylacetoacetate と ALA を反応させてピロール環を形成させた後，Ehrlich 試薬を用いて検出する[8,9,10]．Ehrlich 試薬にはもともと水銀が含まれているが，水銀を除いても使用可能である[9]．

通常は，多くの生物の細胞内においては，ALA の蓄積量はごくわずかである．これは，ALA がすぐに代謝されて，テトラピロール化合物に変換してしまうからだと思われる．細胞にレブリン酸を与えると，ALA の代謝が阻害され，ALA が蓄積する．多くの研究では，レブリン酸を処理した後に蓄積する ALA の量を ALA の合成活性と見なしている．植物の葉においては，このように測定された ALA の合成活性は，クロロフィルの合成活性とよく相関している．シロイヌナズナの場合，レブリン酸を処理する時間が 90 分を超えると，ALA の分解が起こる可能性があるので，レブリン酸の処理は 90 分以内にとどめておいた方がよい．30 分，60 分，90 分というように，いくつかの処理時間を試し，処理時間と ALA 蓄積量が比例している範囲で，ALA 合成活性を測定する必要がある．

*Chlorella* おいては，レブリン酸処理によって ALA が細胞外に排出されるとの報告がある[11]．藻類において，ALA 合成活性を測定する際には注意が必要であろう．

ALA の前駆体である glutamate-1-semialdehyde は不安定な中間体であり，生物試料から抽出して，定量したという報告はない．また，glutamyl-tRNA から glutamate-1-semialdehyde を合成する glutamyl-tRNA reductase と glutamate-1-semialdehyde から ALA を合成する glutamate-1-semialdehyde aminomutase は複合体を作っていると考えられており，中間体である，glutamate-1-semialdehyde が細胞内に蓄積しているとは考えにくい．

$tRNA^{Glu}$ の定量は northern blotting によって行う[12]．$tRNA^{Glu}$ はタンパク質合成の基質でもあり，$tRNA^{Glu}$ の増減はテトラピロール合成だけでなく，葉緑体内のタンパク質合成にも影響を与えると予想される．従って，生物が $tRNA^{Glu}$ の増減でテトラピロールの量を調節しているとは考えにくい．(ヘムとクロロフィルを含めた)テトラピロール合成の調節は glutamyl-tRNA から glutamate-1-semialdehyde を経て ALA を合成する段階で調節されていると考えられる．

**Porphobilinogen**　ALA 2 分子が縮合するとピロール環をもつ porphobilinogen（PBG）が生成される．PBG の定量は，原理的に ALA の定量法と同様に Ehrich 試薬を用いればよい．Mock らは，PBG を 95℃で熱することによって，uroporphyrin I に変換し，HPLC によって定量する方法を紹介している[13]．(注：uroporphyrin I は uroporphyrinogen I が酸化されたもので，uroporphyrinogen I は uroporphyrinogen III の D ring が逆向きに付加されたテトラピロール分子である．) PBG のモル吸光係数は，Mauzeall と Granick によると 2N の perchloric acid を含む Ehrlich 試薬中で，61 $mM^{-1}cm^{-1}$（555 nm）である[14]．

**Hydroxymethylbillane**　この分子も不安定であり，自動的に閉環して uroporphrinogen I を生成する．uroporphyrinogen III synthase が存在すると D 環が反転して，テトラピロールを形成し，uroporphyrinogen III となる．hydroxymethylbillane は細胞内ではほとんど蓄積していないと考えられる．

**Uroporphyrinogen III から Protoporphyrin IX**　これらの化合物は全てテトラピロール化合物である．uroporphyrinogen III，coproporphyrinogen III，protoporphyrinogen IX の 3 つの化合物では，4 つの methene bridge

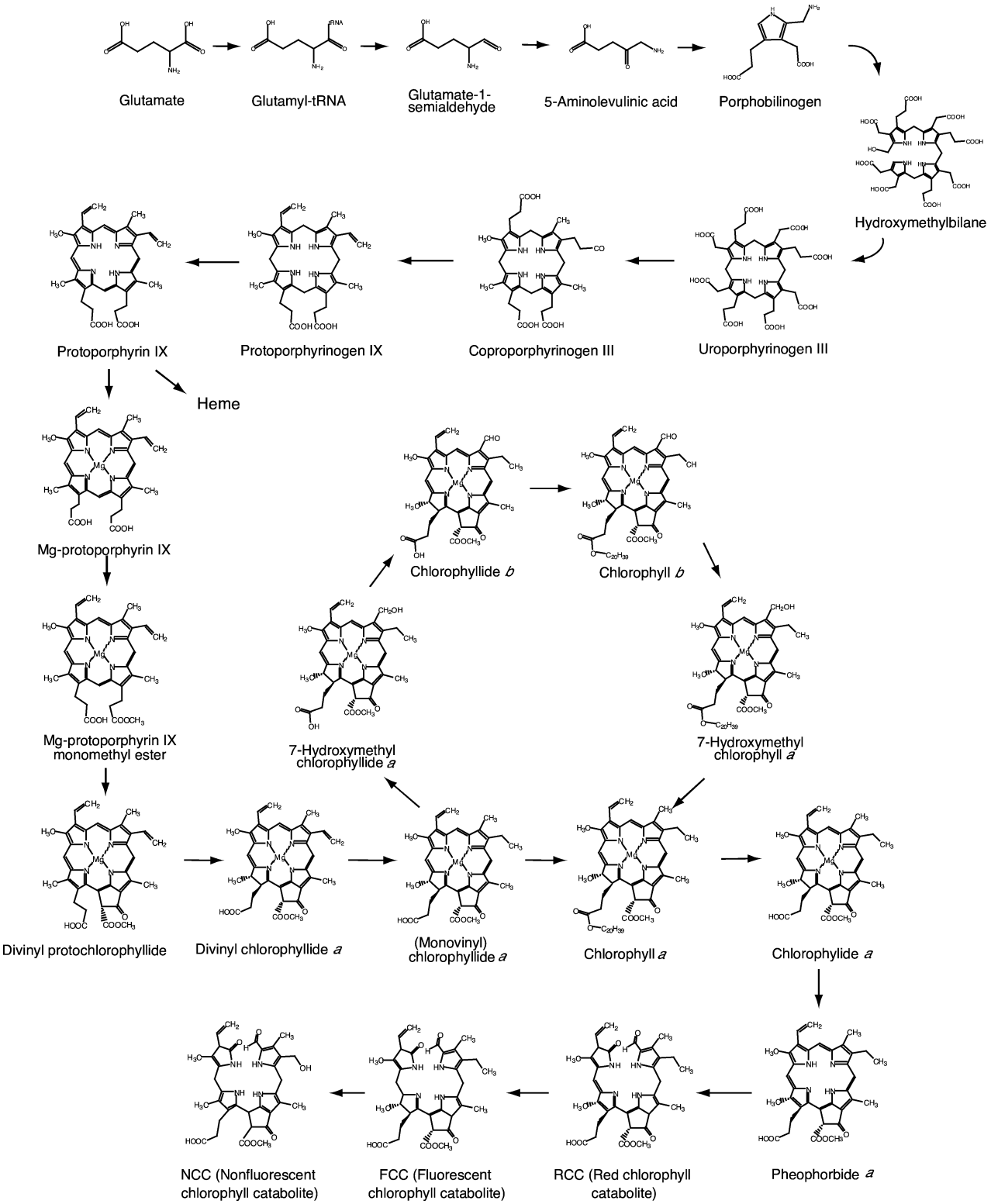



図 3：被子植物のクロロフィル代謝経路

が還元されているが，protoporphyrin IX は酸化されている．前者の 3 つの化合物は，テトラピロール環が共役していないので無色であるが，後者はテトラピロール環が共役しており，赤色で，蛍光を発する．（後述する Zapata らの HPLC の分離システムのＡ溶媒中において，励起極大波長が 400 nm，蛍光極大波長が 634 nm である．）uroporphyrinogen III，coproporphyrinogen III，protoporphyrinogen IX の 3 つは，抽出中に自動的に酸化してしまって，uroporphyrin III，coproporphyrin III，protoporphyrin IX になる．HPLC を用いて定量する場合は，酸化した化合物を蛍光検出器を用いて定量する．uroporphyrin III，coproporphyrin III の場合は，細胞内では uroporphyrinogen III，coproporphyrinogen III であったと仮定してよいが，protoporphyrin IX の場合は，それが，生体内で protoporphyrinogen IX であったのか，protoporphyrin IX であったのか，判別することは難しい．抽出液中の uroporphyrinogen III，coproporphyrinogen III，protoporphyrinogen IX を完全に酸化させるために，2-butanone peroxide などの酸化剤を抽出液に加えることもある[15]．

Protoporphyrin IX は，後述する Zapata らの方法[1] で定量が可能であり，また，uroporphyrin III，coporoporphyrin III の定量も可能であると思われるが，uroporphyrin III，coproporhyrin III の定量に関しては，筆者らの研究室では，まだ確認していない．そこで，本稿では，この 2 つの化合物の定量に関して，Bernhard Grimm（ドイツ，Humboldt 大学）の研究室で行われている方法[15] を紹介する．

色素の抽出：100 mg の葉を 200 μl の 50 mM のリン酸カリウムバッファー（pH 7.8）中で破砕し，遠心し，上清を別なチューブに移す．続いて，沈殿を 200 μl の methanol/0.1 M ammonium hydroxide（9：1 v/v）に懸濁し，遠心し，上清をチューブに集める．再び，沈殿を 200 μl の acetone/methanol/0.1 M ammonium hydroxide（10：9：1，v/v/v）懸濁し，遠心を繰り返す．最終的に上清を一本のチューブに集める．抽出液に，acetic acid と 2-butanone peroxide を最終濃度がそれぞれ 25 mM と 2.5%になるように加え，ポルフィリン化合物を酸化させる．

HPLC による分離：Novapak C18，4 μm particle size，3.9 x 150 mm（Waters）を用いる．A溶媒（methanol/0.1 M ammonium acetate pH 5.2/水＝1：1：8，v/v/v）とB溶媒（methanol/0.1 M ammonium acetate pH 5.2＝9：1，v/v/v）のグラジエントで分離する．流速は 1 ml/min で，最初の 12 分間にA溶媒 100%，B溶媒 0 %からA溶媒 0 %，B溶媒 100%のグラジエントをかけ，続く 13 分間は，B溶媒 100%ですべての色素を溶出する．蛍光検出器が必須で，励起波長は 405 nm，蛍光波長は 615 nm にあわせる．標準物質を入手し（例えば，Frontier Scientific Inc.などから入手できる．http://www.frontiersci.com/），検量線を作成した上で定量する必要がある．

**Mg-Proto IX，Mg-Proto IX monomethylester**　これらの化合物は，Mg2＋が配位しており，強い蛍光を発する．クロロフィルとは異なって，phytol などの側鎖がついていないので，比較的親水性で，20%程度の水を含む acetone や diethylether などによく溶ける．筆者の研究室では Zapata らの系を用いて分離，定量している（4 章参照）．

**Protochlorophyllide**　被子植物の場合，Protochlorophyllide は暗所におけるクロロフィル合成経路の最終産物である．Protochlorophyllide には，3, 8-divinyl-(DV)-protochlorophyllide，3-vinyl-(MV)-protochlorophyllide の 2 つの化合物が存在する．前者は 8 位に vinyl 基が付加しているが，後者ではこれが還元されて ethyl 基になっている．DV-protochlorophyllide と MV-protochlorophyllide は吸収極大波長が若干異なっており，diethylether 中での Soret 帯の吸収極大波長はそれぞれ，432 nm と 437 nm である[16]．DV-protochlorophyllide から MV-protochlorophyllide への還元反応を触媒するのは，8-vinyl chlorophyllide reductase である[17,18] が，この酵素は，protochlorophyllide に対する活性が低いので，8-vinyl 基の還元に時間がかかる．その結果，双子葉植物では，主に DV-protochlorophyllide が蓄積する[19)16)] が，暗所で生育させる期間が長いほど，MV-protochlorophyllide の割合が高くなる[16] という現象が観察される．単子葉植物の子葉では，MV-protochlorophyllide の蓄積が主に観察される[16]．単子葉植物の 8-vinyl chlorophyllide reductase は，比較的 DV-protochlorophyllide に対する活性が高いと考えられる．

Protochlorophyllide の抽出において，最も大切な点は，組織が完全に破砕され，acetone に懸濁されるまで，可視光にあてない，という点である．protochlorophyllide が光を吸収すると，そのエネルギーを使って，暗所で protochlorophyllide に結合している protochlorophyllide oxidoreductase（POR）が瞬時に protochlorophyllide を還元して，chlorophyllide を生成してしまう．この反応は 77 K でも起こりうる．したがって，完全な暗所で組織の破砕を行うべきであるが，難しければ，緑色の蛍

光灯に緑色のセロファンをまいた「安全灯」のもとで暗室内で色素の抽出を行う．このとき，光の強度は，目が慣れてやっとものが見える程度の明るさまで落とす必要がある．あるいは，赤外光の照射下で赤外線カメラを使用して抽出を行う，という方法もある．protochlorophyllide の定量にはいくつかの方法が報告されているが[20,21,22]，本稿では，4 章で HPLC を用いる方法を述べる．

**Chlorophyllide**　上述の通り，protochlorophyllide が還元されると chlorophyllide になる．chlorophyllide は，phytol が結合していないので，比較的親水性である．in vivo では，DV 型の chlorophyllide は生成されるとすぐに MV 型に還元されてしまうので，通常は DV 型の chlorophyllide が観察されることはない．また，MV-chlorophyllide もすぐに phytol と結合して，chlorophyll になるようである．したがって，少なくとも被子植物の場合，観察される chlorophyllide は，多くの場合，chlorophyll の合成経路の中間体というよりは，むしろ，chlorophyll が chlorophyllase のはたらきによって分解された産物であると思われる．また，シロイヌナズナの葉を材料とした場合，微量の chlorophyllide a は頻繁に検出されるが，chlorophyllide b はまれにしか検出されない．筆者の経験では，chlorophyllide b が検出されるのは，抽出液に含まれている chlorophyllase によって，抽出の際に生成された artifact であることが多い．このような場合には，クロロフィルを抽出するときに acetone の量を増やすことによって，chlorophyllase の活性を抑えることができる場合がある．

**Chlorophyll**　chlorophyll *a* または *b* のみを測定する場合には，第 2 章に記載の方法を用いるのが最も簡便である．これ以外のクロロフィルを測定する場合には，第 4 章で述べるように，HPLC を用いる必要がある．Zapata らの原報[1]には，彼らの HPLC における chlorophyll *c1, c2, c3* の溶出位置が報告されているので参照していただきたい．

**クロロフィルの誘導体**　ほとんどの酸素発生型光合成生物のもつクロロフィルの 17 位は ethyl 基となっているが，例外的に 17 位に vinyl 基を持つ DV-chlorophyll *a* および DV-chlorophyll *b* を合成するラン藻の一群が存在する[23]．また，これも例外的であるが，phytol 鎖の代わりに geranyl-geranyl（GG）鎖，あるいは，GG 基の 2 重結合が一ヶ所，または 2 ヶ所還元された，dihydrogeranyl-geranyl（DHGG）基，tetrahydrogeranyl-geranyl（THGG）基を側鎖にもつクロロフィルも存在する．これらのクロロフィルは，キュウリや大麦など被子植物の黄化芽生えが緑化する際に見つかることがある．これらの化合物は，基本的にクロロフィルとよく似た性質を持っており，大半は 4 章に記載した方法で分離することができる．

また，chlorophyll *a* から Mg イオンが抜けた pheophytin *a* や 13(2) 位の epimer（chlorophyll *a'* と呼ぶ）も光化学系に存在する．pheophytin *a* は 4 章の方法で分離することができる．chlorophyll *a'* の分離については，中村らの方法[4,24]を参照されたい．

**Hydroxymethyl-chlorophyll a**　この化合物は chlorophyll *b* が chlorophyll *a* に変換されるときの中間体である．chlorophyll *b* から *a* への変換は，植物が環境に適応して，chlorophyll *a* と *b* の比率を調整するときや，chlorophyll *b* が chlorophyll *a* を経て分解されるときにおこると考えられている．シロイヌナズナの葉には，常に chlorophyll *a* の 0.1%程度存在するようである．Scheumann らは，オオムギの葉の老化初期に hydroxymethyl-chlorophyll *a* の蓄積が増加すると報告している[25]．この化合物も 4 章の記載した方法で分離することができる．

**クロロフィルの分解産物**　クロロフィルの分解経路の研究は主に高等植物を材料として行われている[26]．現在のところ，chlorophyll *b* を直接分解する経路は知られておらず，大半の chlorophyll *b* は一度 chlorophyll *a* に変換されてから分解されると考えられている[27]．chlorophyll *a* は chlorophyllase の活性によって，chlorophyllide *a* になり，$Mg^{2+}$ が抜けて，pheophorbide *a* になる，というのが，通説であるが[26]，chlorophyllase の役割については異論もある[28]．pheophorbide *a* は red chlorophyll catabolite (RCC), fluorescent chlorophyll catabolite (FCC), non-fluorescent chlorophyll catabolite と変換されるのが，主要な分解経路と考えられている．ダイコン（*Raphanus sativus*）など一部の植物には，pheophorbide *a* の 13 位の methoxycarbonyl 基が外れた pyropheophorbide *a* が生成される経路も存在する[29]．

クロロフィルの分解産物のうち，pheophorbide *a* までは 4 章に記載した方法で，分離することができる．クロロフィルは分解が進むと次第に親水性が増すので，RCCR 以降の分解産物を 4 章に記載した Zapata らの方法[1]で分離することはできない．これらの分解産物を分離するには，Hörtensteiner らの方法[30,31]を参照していただきたい．

## 5.a.4 Zapata らの方法によるクロロフィルと代謝中間体の分離と定量

この章では，Zapata らの方法[1]によるクロロフィルと代謝中間体の分離と定量について述べる．この方法で分離，同定できる化合物を表1に示した．クロロフィル類の他に protoporphyrin IX 以降，pheophorbide *a* までのほとんどの代謝中間体を分離することができる．いくつかの物質は，（例えば chlorophyllide *a* と Mg-protoporphyrin IX）は溶出時間が同一であるので，定量には注意が必要である．これらの注意点に関しては，適宜，項目を設けて記載した．また，この方法では，カロチノイド類も同時に検出することができる．カロチノイド類の定量は，本稿の範囲ではないが，クロロフィルと同時にカロチノイド類の定量を行う読者のために，有用と思われる情報を付記した．カロチノイド類の定量の詳細に関しては，高市の稿を参照していただきたい．また，この章に記載した方法で測定した，一部の代謝中間体の

**表1**：本稿の4章で紹介した HPLC システムにおける色素の溶出時間とそれぞれの色素の吸収極大，モル吸光係数およびモル吸光係数の出典の文献

| 色素名 | 溶出時間（分）(a) | 吸収極大(b) | モル吸光係数 | 溶媒 | 文献 |
|---|---|---|---|---|---|
| 7-hydroxymethyl chlorophyllide | 3.3 | n. d. | 7-hydroxymethyl Chl と同じ | | |
| chlorophyllide *b* | 4.7 | n. d. | Chl *b* と同じ | | |
| chlorophyllide *a* | 9.2 | 430，664 | Chl *a* と同じ | | |
| Mg-proto IX | 9.2 | 416 | 165900（417） | 80% acetone | [36] |
| DV-Pchlide | 9.9 | 439，629 | 205000（437）<br>22100（622） | diethylether | [37] |
| pheophorbide *b* | 10.1 | n. d. | n. d. | | |
| MV-Pchlide | 10.4 | 436，626 | 241000（432）<br>31100（623） | 80% acetone | [38] |
| Mg-protoIX monomethylester | 11.7 | 416 | Mg-proto IX と同じと思われる | | |
| proto IX | 13.7 | 402 | 150000（404） | diethylether | [39] |
| pheophorbide *a* | 14.2 | 409，664 | 44500（667） | ethanol | [40] |
| neoxanthin | 15.9 | 413，437，466 | | | |
| violaxanthin | 17.0 | 418，440，470 | | | |
| lutein | 19.8 | 446，474 | | | |
| Chl *b*（GG） | 20.1 | 461，647 | Chl *b* と同じ | | |
| Chl *b*（DHGG） | 21.0 | 461，647 | Chl *b* と同じ | | |
| Chl *b*（THGG） | 21.9 | 461，647 | Chl *b* と同じ | | |
| Chl *a*（GG） | 22.0 | 431，664 | Chl *a* と同じ | | |
| hydroxymethyl Chl | 22.4 | 434，657 | 61100（655.5） | diethylether | [41] |
| Chl *a*（DHGG） | 22.7 | 431，664 | Chl *a* と同じ | | |
| Chl *b* | 22.9 | 461，647 | 47040（646.6） | 80% acetone | [2] |
| DV-Chl *b* | 22.9 | 466，650 | 43910（643）<br>50530（651） | diethylether<br>80% acetone | [42] |
| Chl *a*（THGG） | 23.4 | 431，664 | Chl *a* と同じ | | |
| DV-Chl *a* | 24.1 | 441，664 | 78340（660）<br>69290（664） | diethylether<br>80% acetone | [42] |
| Chl *a* | 24.3 | 431，664 | 76790（663.6） | 80% acetone | [2] |
| pheophytin *a* | 26.2 | 409，665 | 50530（665） | diethylether | [42] |
| *β*-carotene | 26.8 | 451 | | | |

(a) 溶出時間については，筆者の研究室における複数のクロマトグラムをもとに，実験間での溶出時間の誤差を計算によって補正して，一覧に示した．用いる HPLC システムによって，溶出時間は変わりうるので，各々の研究室ごとに標準物質を用いて，溶出時間を確認する必要がある．

(b) この欄に示した吸収極大は，HPLC のフォトダイオードアレイ検出器のデータをもとにした．±2 nm の誤差がありえる．よく似た色素であっても，溶出時間によって，溶媒組成が異なるので，吸収極大はシフトすることがある．テトラピロール化合物に関しては，Soret 帯と Qy 帯の吸収極大を示した．カロチノイド類については，S2 吸収帯の極大波長を示した．

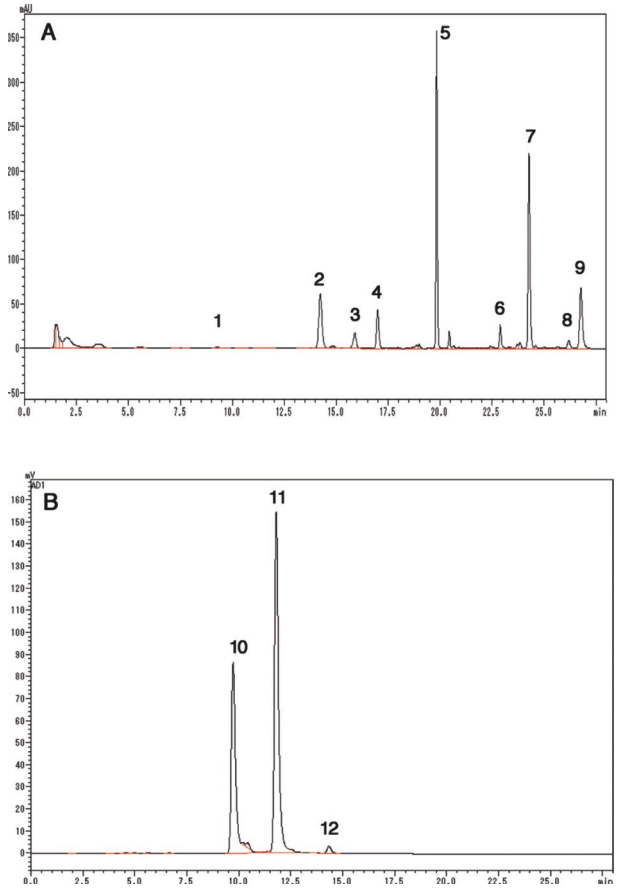



**図4**：Zapata らの系による光合成色素の分離
A．シロイヌナズナの葉の抽出液の分離．横軸は溶出時間（分），縦軸は 410 nm における吸収．：1.chlorophyllide *a*，2.pheophorbide *a*，3.neoxanthin，4.violaxanthin，5.lutein，6.chlorophyll *b*，7.chlorophyll *a*，8.pheophytin *a*，9.*β*-carotene　B．クロロフィル代謝中間体（標準物質）の分離．蛍光検出器（Shimadzu, RF550）を用いて，励起波長 417 nm，蛍光波長 600 nm で測定した．：10.Mg-protoporphyrin IX，11.Mg-protoporphyrin IX monomethylester，12.protoporphyrin IX

吸収スペクトルが，光合成事典[32]に記載されているので，参照していただきたい．

また，光合成色素の分離に関しては，van Haukelem らが，数十種類の色素を HPLC で分離する方法を報告している[33]．彼らの方法は，藻類の光合成色素の分離に特に有用だと思われる．

### 5.a.4.1　HPLC のためのクロロフィルと代謝中間体の抽出方法

筆者は，植物の葉からクロロフィルや代謝中間体を抽出するために，acetone を用いている[注2]．水や buffer を加えた 80% acetone などを用いることも出来るが，上述のように，抽出液中の水分含量が 5 %を超えると chlorophyllase によって chlorophyll *a* と chlorophyll *b* が phytol 鎖と chlorophyllide に分解されてしまい，正確な測定が困難になることがある．特に，ストレスを受けた葉からクロロフィルを抽出するときは注意が必要である．（2 章に記述した方法で，HPLC を使わずにクロロフィルを定量する場合には，chlorophyllase の作用を気にする必要はない．chlorophyllide と chlorophyll の吸光スペクトルは同一である．）

一方，ラン藻，プラシノ藻，珪藻などの場合は，80% acetone や acetone/methanol（50：50，v/v）などの溶媒で色素を抽出することが多い．これらの生物では，chlorophyllase の活性が見られることはなく，また，pure acetone を用いるよりも，これらの溶媒を用いる方が抽出効率が高いことがある．固い殻を持つ藻類の場合，ガラスビーズ等による破砕が必要になる場合もある．筆者の研究室では，Mini-Beadbeater（Biospec Products Inc. OK, USA）を用いる場合もある．

### 5.a.4.2　HPLC のシステム

筆者は，以下の HPLC システムを使用している[注3]．

システム 1（Hitachi 製）
　ポンプ：L-7100（低圧グラジエントシステム）
　検出器 1：フォトダイオードアレイ検出器 L-2450
　検出器 2：蛍光検出器 L-2485
　オートサンプラー：L-7200
　カラムオーブン：L-7200
　デガッサー：L-7610

システム 2（Shimadzu 製）
　ポンプ：LC-10ATvp
　ミキサー：FCV-1-ALvp
　検出器 1：フォトダイオードアレイ検出器 SPD-M10Avp
　検出器 2：蛍光検出器 RF-550
　オートインジェクター：SIL-10ADvp

---

注2　クロロフィルの代謝中間体を植物から抽出するために，リン酸バッファーや 90% methanol など 3 種類の溶媒を順番に用いる方法が報告されているが 34）A. Strand, T. Asami, J. Alonso, J. R. Ecker and J. Chory. Nature **421** (2003) p.79.，この方法は単に煩雑なだけでなく，chlorophyllase の作用が見られることがあり，あまり薦められない 35）N. Mochizuki, R. Tanaka, A. Tanaka, T. Masuda and A. Nagatani. Proc Natl Acad Sci U S A **105** (2008) p.15184.．Mg-Proto IX などのクロロフィル代謝の中間体の acetone への溶解度はあまり高くないので，標準品などを高濃度で扱う場合には水分含量の低い acetone は適さないが，植物試料中のクロロフィル代謝中間体の濃度は非常に低いので，acetone で十分に抽出可能である．

注3　原報 1）M. Zapata, F. Rodriguez and J. L. Garrido. Marine Ecology-Progress Series **195** (2000) p.29.では，3 種類の HPLC システムを比較している．システムによっては，溶媒のグラジエントのかけ方を多少変更する必要があるようだ．

カラムオーブン：CTO-10Avp
デガッサー：DGU-14A
コントローラー：SCL-10Avp

### 検出器

筆者はフォトダイオードアレイ検出器を用いて，400 nm–700 nm の範囲で吸光度を記録している．通常の一波長型の吸光検出器でも構わないが，2 種類以上の色素がほぼ同じ時間に溶出されることがあり，一波長型の吸光検出器では見落としてしまうことがある．一波長型の検出器を用いる場合は，研究対象としている色素以外の色素の溶出位置を確認しておいた方がよい．

また，protoporphyrin IX 以降のクロロフィル代謝の中間体の検出をする場合は，蛍光検出器が必須であると考えた方がよい．吸光光度計とは違って，蛍光検出器の場合は，ランプの劣化によって，シグナルが低くなってくるので，定量を目的としている場合は，頻繁に標準物質を流す必要がある．protoporphyrin IX を検出する場合は，蛍光検出器の励起波長を 400 nm，蛍光波長を 635 nm にあわせる．Mg-protoporphyrin IX，Mg-protoporphyrin IX monomethylester を検出する場合は，蛍光検出器の励起波長を 417 nm，蛍光波長を 600 nm にあわせる．同時に検出する場合は，蛍光検出器のタイムプログラムを利用して，Mg-protoporphyrin IX monomethylester の溶出のあとで，蛍光波長を切り替える．

Zapata の系に特有の問題として，ピリジン（または，ピリジンに混入している物質）の 595 nm 付近の蛍光がある．一波長型の吸光光度計の場合は問題にならないが，蛍光光度計の場合や，特にフォトダイオードアレイ検出器の場合は，奇妙なスペクトルが見られる原因となるので，注意してほしい．

### カラム

カラムは，Symmetry C8, 150×4.6 mm, 3.5 μm particle size[注4]（Waters）で，ガードカラムとして，Phenomenex（AJO-4290）C8 4.0（L）mm ×3.0（ID）mm を使用している．カラム温度は 40°C に設定している．

### 溶媒

A溶媒：Methanol: Acetonitrile: 0.25 M aqueous pyridine＝ 50：25：25（v:v:v）

B溶媒：Methanol: acetonitrile: acetone＝20：60：20（v:v:v）

A溶媒のピリジンは酢酸で pH を 5.0 にあわせる．われわれの研究室では，pH メーターを使って，ピリジン溶液の pH をあわせ，必要な酢酸の量を測っておき，2 回目の溶媒調整からは pH メーターを使わずに一定量の酢酸をピリジン水溶液に足すようにしている．酢酸の量は色素の保持時間に大きな影響を与えるので，常に一定量の酢酸を加えるようにすると，毎回 pH メーターを使って溶液を調製するよりも簡便に再現性を保つことができる．

### サンプルのインジェクションついて

サンプル容量が 20 μl 以下の場合は，抽出液（100％に近い濃度の acetone）をそのままインジェクションしても構わない．しかし，サンプル容量が 20 μl を超える場合は，サンプル抽出液とA溶媒のミスマッチによって，ピークのテイリングがおこる．サンプルに 20％程度の水を加えるとテイリングを抑えることができる．しかし，サンプルに水を加えると，時間とともに β-carotene の沈殿がおこるので，β-carotene の検出をする場合は，水を加えたらすぐにサンプルをインジェクションする必要がある．また，水の存在下では，クロロフィル類の修飾がおこりやすいと思われるので，微量のクロロフィルの検出，定量をするばあいは，できるだけ水は加えない方がよいと思われる．

オートサンプラーを使う場合，もう一つ注意しないといけないのは，サンプルバイアルからの蛍光物質の溶出である．ポリプロピレン製のバイアルを使うと蛍光物質が溶出されることがあるので，クロロフィル代謝中間体を分離する際には，ガラス製のバイアルを使用するか，事前に蛍光物質の溶出がないことを確認してポリプロピレンバイアルを使用する（京都大学・望月伸悦博士・私信）．

### タイムプログラム

A溶媒 100％，B溶媒 0％から開始して，直線的なグラジエントをかける．phytol 鎖をもたない物質は主にA溶媒で溶出され，phytol 鎖をもつ物質は主にB溶媒で溶出される．筆者の研究室では流速をあげて，原報[1]よりも若干解析時間を短縮している．

流速 1.2 ml/min

| | | |
|---|---|---|
| 0 min | B溶媒 | 0％ |
| 12 min | | 40％ |
| 17 min | | 95％ |

[注4] 同じ Waters 製の Sunfire という C8 カラムも試してみたが，β-carotene と pheophytin a が同じ位置に溶出してしまった．

| | |
|---|---|
| 22.5 min | 95% |
| 25 min | 0 % |
| 30 min | 0 %（5 分間平衡化してから，次のサンプルをインジェクション） |

### 検量線について

原理的には，HPLC の吸光検出器のピーク面積から，モル吸光係数を使って色素の濃度を見積もることは可能であると思われるが，筆者の研究室では，基本的に標準物質を購入するか，または生物試料から調製して，検量線を作成している．Mg-protoporphyrin IX，Mg-protoporphyrin IX monomethylester は Frontier Scientific Inc.で購入できるが，特注になる．protoporphyrin IX，pheophorbide a は和光純薬やフナコシ，コスモバイオなどで購入できる．protochlorophyllide はキュウリや大麦の暗所芽生えから精製する[19]．クロロフィルも各社から購入できる．標準物質の濃度を見積もるために，モル吸光係数が必要となるので，モル吸光係数を表 1 に示した．

## 5.a.5 おわりに

クロロフィルおよびその代謝中間体の検出には，さまざまな方法が開発されている[33]．本稿では，筆者の研究室で実際に使っている，比較的簡便で応用のきく分析方法を紹介したが，これらの方法ですべてのクロロフィルとその代謝中間体が測定できるわけではないので，目的にあった分析系を選んで使い分ける必要があると思われる．

### Abbreviations

**GG: geranylgeranyl, DV: divinyl, MV: monovinyl, Chl: chlorophyll, Chlide: chlorophyllide, DHGG: dihydrogeranylgeranyl, THGG: tetrahydrogeranylgeranyl**

### 謝辞

本稿の執筆にあたって，さまざまな情報を提供していただいた北海道大学・低温科学研究所の田中歩教授，伊藤寿博士，Wesley Swingley 博士，得津隆太郎氏，長根智洋氏，岸本純子氏，田中佐知子氏，に感謝いたします．また，作図に関して，同研究所の岸本純子氏に感謝いたします．

## 参考文献

1）M. Zapata, F. Rodriguez and J. L. Garrido. Marine Ecology-Progress Series **195** (2000) p.29.
2）R. Porra, W. Thompson and P. Kriedemann. Biochim Biophys Acta **975** (1989) p.384.
3）M. Latasa, K. van Lenning, J. L. Garrido, R. Scharek, M. Estrada, et al. Chromatographia **53** (2001) p.385.
4）A. Nakamura and T. Watanabe. Analytical Sciences **17** (2001) p.503.
5）D. I. Arnon. Plant Physiol **24** (1949) p.1.
6）W. P. Inskeep and P. R. Bloom. Plant Physiol **77** (1985) p.483.
7）R. Tanaka and A. Tanaka. Annu Rev Plant Biol **58** (2007) p.321.
8）D. Aarti, R. Tanaka, H. Ito and A. Tanaka. Photochem Photobiol **83** (2007) p.171.
9）D. Goslings, R. Meskauskiene, C. Kim, K. P. Lee, M. Nater, et al. Plant J **40** (2004) p.957.
10）E. Kruse, B. Grimm, J. Beator and K. Kloppstech. Planta Heidelberg **202** (1997) p.235.
11）S. I. Beale. Plant Physiol **45** (1970) p.504.
12）T. Masuda, R. Tanaka, Y. Shioi, K. Takamiya, C. G. Kannangara, et al. Plant Cell Physiol **35** (1994) p.183.
13）H. P. Mock and B. Grimm. Plant Physiol **113** (1997) p. 1101.
14）D. Mauzerall and S. Granick. J Biol Chem **219** (1956) p. 435.
15）A. E. Alawady and B. Grimm. Plant J **41** (2005) p.282.
16）Y. Shioi and K. Takamiya. Plant Physiology **100** (1992) p.1291.
17）H. Nakanishi, H. Nozue, K. Suzuki, Y. Kaneko, G. Taguchi, et al. Plant Cell Physiol **46** (2005) p.467.
18）N. Nagata, R. Tanaka, S. Satoh and A. Tanaka. Plant Cell **17** (2005) p.233.
19）N. Nagata, R. Tanaka and A. Tanaka. Plant Cell Physiol **48** (2007) p.1803.
20）C. A. Rebeiz (2002) Analysis of intermediates and end products of the chlorophyll biosynthetic pathway. In: Smith AG, Witty M, editors. Heme, Chlorophyll, and Billins: Methods and Protocols. NJ: Humana Press. pp. 111.
21）T. Masuda, N. Fusada, N. Oosawa, K. i. Takamatsu, Y. Y. Yamamoto, et al. Plant & Cell Physiology **44** (2003) p.963.
22）F. Franck, U. Sperling, G. Frick, B. Pochert, B. van Cleve, et al. Plant Physiol **124** (2000) p.1678.
23）M. Helfrich, A. Ross, G. C. King, A. G. Turner and A. W. Larkum. Biochim Biophys Acta **1410** (1999) p.262.
24）A. Nakamura, M. Akai, E. Yoshida, T. Taki and T. Watanabe. Eur J Biochem **270** (2003) p.2446.
25）V. Scheumann, S. Schoch and W. Rudiger. Planta **209**

(1999) p.364.
26) S. Hortensteiner. Annu Rev Plant Biol **57** (2006) p.55.
27) M. Kusaba, H. Ito, R. Morita, S. Iida, Y. Sato, et al. Plant Cell **19** (2007) p. 1362.
28) N. Schenk, S. Schelbert, M. Kanwischer, E. E. Goldschmidt, P. Dormann, et al. FEBS Letters **581** (2007) p. 5517.
29) Y. Suzuki, T. Amano and Y. Shioi. Plant Physiology **140** (2006) p.716.
30) A. Pruzinska, I. Anders, S. Aubry, N. Schenk, E. Tapernoux-Luthi, et al. Plant Cell **19** (2007) p.369.
31) A. Pruzinska, G. Tanner, S. Aubry, I. Anders, S. Moser, et al. Plant Physiol **139** (2005) p.52.
32) 光合成研究会（2003）光合成事典．東京：学会出版センター．
33) L. Van Heukelem and C. S. Thomas. Journal of chromatography **910** (2001) p.31.
34) A. Strand, T. Asami, J. Alonso, J. R. Ecker and J. Chory. Nature **421** (2003) p.79.
35) N. Mochizuki, R. Tanaka, A. Tanaka, T. Masuda and A. Nagatani. Proc Natl Acad Sci U S A **105** (2008) p. 15184.
36) C. A. Rebeiz (2002) Analysis of intermediates and end products of the chlorohyll biosynthetic pathway. In: Smith AG, Witty M, editors. Heme, Chlorophyll, and Bilins: Methods and Protocols. NJ: Humana Press. pp. 111.
37) C. Houssier and K. Sauer. Biochim Biophys Acta **172** (1969) p.492.
38) A. Kahn. Physiologia Plantarum **59** (1983) p.99.
39) P. Hukmani and B. C. Tripathy. Anal Biochem **206** (1992) p.125.
40) I. Eichwurzel, H. Stiel and B. Roder. J Photochem Photobiol B **54** (2000) p.194.
41) H. Ito, T. Ohtsuka and A. Tanaka. J Biol Chem **271** (1996) p.1475.
42) V. P. Shedbalkar and C. A. Rebeiz. Anal Biochem **207** (1992) p.261.

# 5．色素の分析
## b．ヘムの分析

高橋　重一[1)]，増田　　建[1)]

光合成においてヘムは，光化学系のシトクロムや活性酸素消去系のカタラーゼなどのヘムタンパク質の補欠分子族として，酸化還元や電子伝達に機能している．本章では植物組織からのヘムの抽出・分析方法について紹介する．

## Analysis of Heme in Photosynthetic Organisms

Shigekazu Takahashi, Tatsuru Masuda

Heme is prosthetic group of hemoproteins, which are responsible for various biological processes including reduction and oxygenation, oxygen metabolism, oxygen transfer, electron transfer and secondary metabolism. In this chapter, we introduce analytical methods of heme in photosynthetic organisms. Variety of hemes, biosynthesis, principle of heme analysis, and several heme assays have been described.

### 5.b.1　ヘムおよびヘムタンパク質の種類

ヘムはポルフィリンの鉄錯体の慣用名である（表1）．ヘムには多くの種類が存在するが，細菌から真核生物にまで広く存在するヘムは，ヘム *a*，ヘム *b*，ヘム *c* である（図1）．その他にヘム *o*，クロロクルオロヘム，またポルフィリンのD環が還元されたクロリン骨格を持つ，ヘム *d*，ヘム $d_1$，シロヘムが存在する（表2）．特に断りがない場合，一般に〝ヘム〟とよぶと，生体内に存在する最も代表的なヘム *b* のことを意味する．

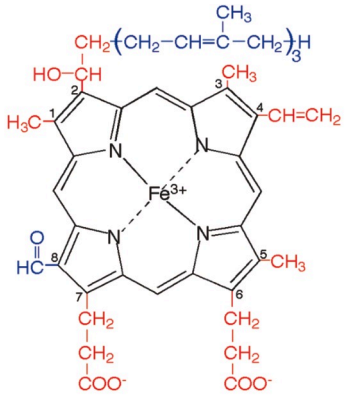
ヘムは，ヘムタンパク質の補欠分子族として機能する．アポタンパク質の構造，ヘムの種類，ヘムとタンパク質の結合様式によって多種類のヘムタンパク質が存在するが，機能的には1）カタラーゼやオキシダーゼなどの酸化還元酵素，2）シトクロム $b_5$ や *c* などの電子伝達体，3）ヘモグロビンやミオグロビンなどの酸素運搬体の3種類に分類できる[1,2)]．また近年，ヘムセンサータンパク質とよばれる一群のタンパク質が同定されている[3)]．これらのタンパク質は，ヘム鉄に酸素や一酸化炭素，一酸化窒素などのガス性シグナルが結合したり[3)]，あるいはヘム分子そのものがタンパク質に結合・解離したりすることがシグナルとなって[4)]，細胞内のさまざまな生理作用に機能している．酸化還元酵素と酸素運搬体のヘムは，主にヘム *b* であり，シトクロムにはヘムの違いにより多くの種類がある（表2）．結合しているヘムが Fe(II) と Fe(III) の酸化還元を繰り返すことで，電子伝達体として機能する．還元型 Fe(II) シトクロムの吸収スペクトルには特徴的な3つのピーク，*α*，*β*，*γ*（Soret）帯がある．最も長波長側の *α* 帯のピークは還元型シトクロムにのみ認められ，吸収波長はシトクロムの種類によって異なる．またシロヘムは植物および細菌の，亜硝酸還元酵素および亜硫酸還元酵素の補欠分子族として機能する．

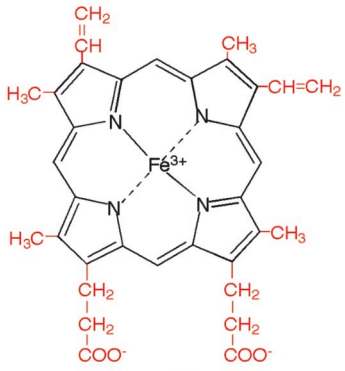
図1に主要なヘムである，ヘム *a*，ヘム *b*，ヘム *c* の構造を示す．ヘム *a* はプロトポルフィリンIXの側鎖の3位に1-ヒドロキシ-2-*trans,trans*-ファルネシルエチル基を持ち，8位にホルミル基を持つ．ヘム *o* は8位がメチル基である以外はヘム *a* と同じ構造をもつ．また古細菌には3位に異なるプレニル骨格を持つヘム *a* やヘム *o* が存在する[5)]．ヘム *b* はプロトポルフィリンIX骨格を持

**表1**：ポルフィリン鉄錯体の慣用名

| | |
|---|---|
| ヘム（heme） | ポルフィリンの鉄錯体 |
| フェロヘム（ferroheme） | ポルフィリンの2価鉄錯体 |
| フェリヘム（ferriheme） | ポルフィリンの3価鉄錯体 |
| ヘモクロム（hemochrome） | 含窒素化合物などが1あるいは2個配位したポルフィリンの鉄錯体 |
| フェロヘモクロム（ferrohemochrome） | 2価鉄のヘモクロム |
| フェリヘモクロム（ferrihemochrome） | 3価鉄のヘモクロム，ヘミクロムともいう |
| ヘミン（hemin） | $Cl^-$ が1個配位したポルフィリンの3価鉄錯体 |
| ヘマチン（hematin） | $OH^-$ が1個配位したポルフィリンの3価鉄錯体 |

1）東京大学大学院総合文化研究科広域科学専攻



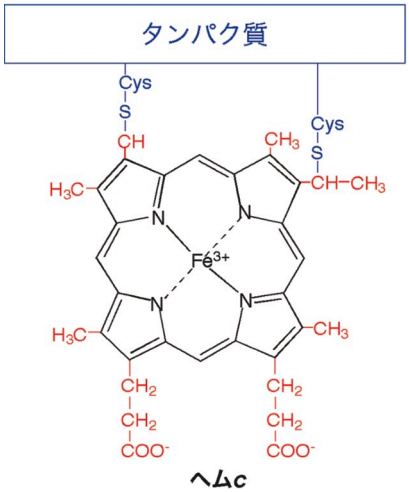




図1：ヘム *a*，ヘム *b*，ヘム *c* の構造

ち，プロトヘムあるいは鉄-プロトポルフィリン IX ともよばれる．ヘム *c* は 4 つのメチル基，2 つのプロピオン酸基，そして 2 つのビニルチオエーテル基を持つ．ヘム *a* とヘム *b* はタンパク質とは非共有結合によりタンパク質と結合しているが，ヘム *c* は 2 つのビニルチオエーテル基がヘムタンパク質のシステイン残基とそれぞれ共有結合している．

## 5.b.2　ヘムの生合成

植物のヘムの生合成（図 2）[6–8] の第 1 段階は 5-アミノレブリン酸（5-aminolevulinic acid：ALA）の合成である．ALA 合成は，全てのテトラピロールの合成量を調節する律速段階となっている．動物，酵母やある種の細菌では，ALA は ALA シンターゼが触媒するスクシニル CoA とグリシンの縮合反応により 1 段階で合成される．これに対して，植物の色素体，シアノバクテリアや多くの細菌では，ALA はグルタミン酸を出発物質とする 3 段階の酵素反応により合成される．グルタミン酸は最初に色素体ゲノムにコードされたグルタミン酸 tRNA と ATP 依存的にアミノアシル化される．このアミノアシル $tRNA^{Glu}$ は，テトラピロール合成だけでなく，色素体タンパク質合成にも使われる．このように代謝系においてアミノアシル tRNA を利用する反応は非常に珍しい．次に，グルタミル tRNA 還元酵素により NADPH 依存的に還元され，アミノ基転移反応によって ALA が生成する．次の一連の反応では，2 分子の ALA が縮合しピロール環を形成した後，さらにそれが 4 分子縮合し，開環テトラピロールを形成する．そして，閉環したテトラピロール環であるウロポルフィリノーゲン III が生成される．ウロポルフィリノーゲン III はシロヘム生合成の基質でもあり，メチル化，酸化，そして鉄配位反応によりシロヘムが合成される．また，ウロポルフィリノーゲン III が 2 段階の酸化的な脱カルボキシル化反応および酸化反応を受けることによりプロトポルフィリン IX が合成される．このプロトポルフィリン IX はクロロフィルとヘム生合成の共通の基質であり，Mg-キラターゼにより $Mg^{2+}$ が配位するとクロロフィル合成系に，フェロキラターゼにより $Fe^{2+}$ が配位するとヘム *b*（プロトヘム）が合成される．ヘム *b* は ALA 合成系のグルタミル tRNA 還元酵素のフィードバック阻害剤として働き，テトラピロール代謝系の合成量を調節する重要な役割を担っている[6,9]．

プロトポルフィリン IX 合成の最後の段階を触媒するプロトポルフィリノーゲン酸化酵素より，前の段階を触媒する全ての酵素は可溶性のタンパク質であり，葉緑体のストロマに局在している[10]．一方，プロトポルフィリノーゲン酸化酵素とフェロキラターゼは膜タンパク質であり，葉緑体の包膜とチラコイド膜の両方に存在すると考えられている[11,12]．これらの酵素は，動物細胞ではミトコンドリアに局在しており，植物細胞においてもミトコンドリアに活性やアイソフォームが存在すると報告されている[13,14]．しかし，植物では色素体におけるヘムの生合

**表 2**：ヘムの種類と吸収特性，機能および存在する生物種

| ヘムの種類 | *α* 吸収ピーク（nm） | 補欠分子族（機能） | 生物種 |
|---|---|---|---|
| ヘム *a* | 584[a] | シトクロム *c* オキシダーゼ（シトクロム $aa_3$）（電子伝達） | 細菌から真核生物 |
| ヘム *b* | 557[a] | ヘモグロビン（酸素運搬）<br>ミオグロビン（酸素運搬）<br>カタラーゼ（酸化還元）<br>ペルオキシダーゼ（酸化還元）<br>シトクロム P−450（酸化還元・電子伝達）<br>*b* 型シトクロム（電子伝達） | 細菌から真核生物 |
| ヘム *c* | 551[a] | *c* 型シトクロム（電子伝達） | 細菌から真核生物 |
| ヘム *o* | 553[a] | シトクロム *o*（シトクロム *bo*，シトクロム *co*）（電子伝達） | 細菌のみ |
| クロロクルオロヘム | | クロロクルオリン（細胞外ヘモグロビン）（酸素運搬） | 環形動物多毛綱カンザシゴカイ科ケヤリ科 |
| ヘム *d* | 613[a] | シトクロム *d*（シトクロム *bd*）（電子伝達） | 細菌のみ |
| ヘム $d_1$ | 620[a] | 亜硝酸塩還元酵素（シトクロム $cd_1$）（酸化還元） | 細菌のみ |
| シロヘム | 550〜560 | 亜硫酸還元酵素および亜硝酸還元酵素（酸化還元） | 細菌から真核生物 |

[a] ピリジンフェロヘムクロムの *α* 吸収ピーク

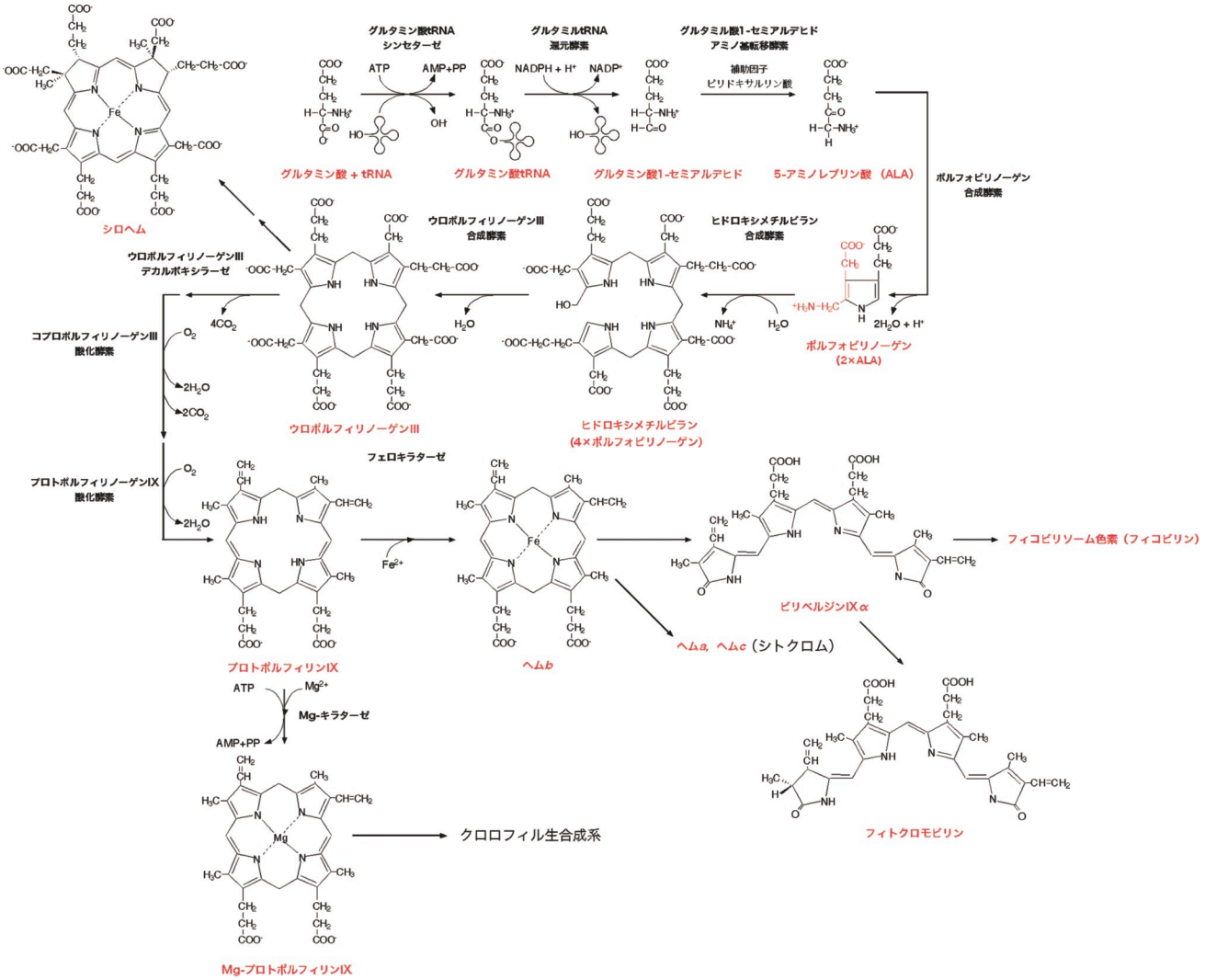



**図 2**：ヘム生合成系．ヘム生合成の第 1 段階は ALA の合成で，高等植物などではグルタミン酸 tRNA に依存した珍しい代謝系である．2 分子の ALA がピロール環を形成し，これが 4 分子縮合して開環テトラピロールを生じた後，閉環して中間体であるプロトポルフィリン IX が作られる．$Fe^{2+}$ が配位することでヘムが合成され，$Mg^{2+}$ が配位するとクロロフィル合成系に進む．

成量が殆どを占めることから，ミトコンドリアにおけるヘム合成の生理的意義は未だ明らかではない[15]．

合成されたプロトヘムは，ヘムオキシゲナーゼによる酸化的開裂を受けビリベルジン IX$\alpha$ に変換される．高等植物ではさらにフィトクロモビリンに変換され，光受容体であるフィトクロムの発色団として機能する．またビリベルジン IX$\alpha$ は，シアノバクテリアや紅藻などのアンテナ系であるフィコビリソーム色素（フィコビリン）の前駆体であり，フィコシアノビリンやフィコエリスロビリンに変換され，アンテナ色素として機能する．

ヘム $a$ の合成に関与する酵素は，未だ同定されていない．ヘム $c$ の合成に関しては，シトクロム $c$ の成熟化過程として研究が行われている．生物種によって異なる 3 つのシトクロム $c$ 成熟システムが存在すると考えられている．いずれも，アポシトクロム $c$，ヘム，アポシトクロム $c$ のシステイン残基とヘムを還元するタンパク質，これらの輸送に関わるタンパク質，そしてヘムを共有結合させる酵素（リアーゼ）などにより構成される，複雑なシステムである[16]．

## 5.b.3　ヘム分析の原理

ヘムの種類を知るには，ヘムの第 5，第 6 配位座にピリジンなどの N 塩基が配位結合したフェロヘモクロムを形成させる．フェロヘモクロムの可視光領域での強い吸収帯はポルフィリン側鎖の電子吸引性の増加とともに長波長側にシフトする性質をもつことから，$\alpha$ 帯の極大吸収波長と吸光係数からヘムの種類の同定と定量を行うことが出来る（表 3）[1,17–20]．また，ヘモクロムの Fe(III) 酸化型（フェリヘモクロム）と $Na_2S_2O_4$ で還元した Fe(II) 還元型（フェロヘモクロム）の差スペクトルを測定し，$\alpha$ 帯の吸光度と等吸収点（isosbestic point）の吸光度の差を求める方法（酸化還元差スペクトルの測定）も一般的なヘムの定量・分析方法である[21]．また非共有結合によりタンパク質に結合しているヘム $a$ とヘム $b$ は，塩酸酸性アセトンで抽出することができる．一方，ヘム $c$ はタンパク質とチオエーテル結合しているため，塩酸酸性アセトン処理では遊離してこない．従って，ヘムタンパク質に結合しているヘムの種類を調べるには，塩酸酸性アセトンによるヘムの抽出の可，不可とフェロヘモクロムの $\alpha$ 吸収帯のピークの位置により分析することができる．

タンパク質と結合した状態のヘムを調べる場合には，そのタンパク質を精製して，分光学的な解析を行う必要がある．また本章では詳しく述べないが，タンパク質に結合しているヘムの配位状態やスピン状態は，共鳴ラマンスペクトル[22,23]や電磁常磁気共鳴（電子スピン共鳴：EPR あるいは ESR）[24–26]により調べることができる．また，非共有結合性のヘムは，塩酸酸性アセトンで抽出後，定量することが可能である．共有結合性のヘム $c$ は，チオエーテル結合を $Ag_2SO_4$ もしくは $Hg_2SO_4$ 処理で切断後，酢酸-エーテル混合液で抽出することが可能であるが，この場合最終的に得られる物質は，3，8 位の側鎖がヒドロキシエチル基に変化したヘマトヘムとよばれる化合物であり，本来の状態とは異なるので注意が必要である．

ヘムはアルカリ性の溶液や生理的な pH では界面活性剤を含む溶液に可溶である[21]．本章では塩酸酸性アセト

**表 3**：ピリジンヘモクロムの吸収と吸光係数

| ヘム | | Soret 帯 (nm) | $\beta$ (nm) | $\alpha$ (nm) | 文献 |
|---|---|---|---|---|---|
| ヘム $b$ | $\lambda$max | 418.5 | 526 (525) | 557 (557) | 17)(1)) |
| （プロトヘム） | $\varepsilon$mM | 191.4 | 17.5(16.0) | 34.4(32.0) | |
| | | | | $\varepsilon mM_{(557nm-541nm)}$20.7 | |
| ヘム $a$ | $\lambda$max | 427 | | 585 (584) | 17) |
| | | | | (30.8) | |
| ヘム $c$ | $\lambda$max | | 522 | 551 | 17) |
| | $\varepsilon$mM | | 18.6 | 29.1 | |
| シロヘム | $\lambda$max | 401 | | 557 | 19) |
| | $\varepsilon$mM | | | 15.7 | |
| メソヘム | $\lambda$max | 407 (407) | 518 (518) | 547 (547) | 17)(19)) |
| | $\varepsilon$mM | 140.4(139.5) | (20.9) | 33.2(35.8) | |
| | | | | $\varepsilon mM_{(547nm-531nm)}$21.7 | |
| デューテロヘム | $\lambda$max | 406 (405.5) | 514 (514) | 545 (544) | 17)(19)) |
| | $\varepsilon$mM | 97.3(134.6) | (18.3) | 24.0(26.4) | |
| | | | | $\varepsilon mM_{(543nm-531nm)}$15.3 | |

ンで抽出可能な非共有結合性のヘム，主にヘム *b* の分析法について述べる．

## 5.b.4　植物からのヘムの抽出法

ヘムは赤血球の血色素として古くから研究されて来ており，動物細胞におけるヘム代謝の研究報告は多く，ヘムの抽出･定量法も確立している[1,17–20]．一方，植物からのヘムの抽出・定量法について述べた論文の数は限られている．ここでは，1978 年の Stillman と Gassman[27] に基づいた，植物組織からのヘム *b* の抽出法を紹介する．後で述べる，高感度なヘム *b* の定量系で測定する場合には，実験のスケールを 100 分の 1 に下げ，5．までの抽出操作を行うことでヘム *b* を定量することが可能である．

[実験方法]

原論文では，ペルオキシド生成によるヘムの分解を防ぐため，全ての操作は照明を暗くした条件(1 fc（カンデラ）以下）で行うとしているが，エーテル抽出までの過程は通常の実験室光下でも問題ないと考えられる．

1．植物組織（1～2 g）に 30 ml の 90%アセトン/10% 0.1 N アンモニアを加え，ワーリングブレンダーなどのホモジナイザーで完全に破砕する．
2．50 ml 遠心管に移し，10,000 xg で 10 分間遠心分離後，上清を取り除く．この上清画分にはクロロフィルおよびその中間体，カロテノイド，脂質などが含まれているため，別途分析に供することが可能である．
3．沈殿を 30 ml の 80%アセトンで洗浄し，再度遠心分離後，上清を取り除く．上清にクロロフィルなどの色素が完全に含まれなくなるまで，操作を繰り返す．
4．沈殿に 25 ml の 2 %塩酸を含むアセトンを加え，ヘムを抽出する．遠心分離後，上清は別の容器に移し，沈殿を再度 25 ml の塩酸アセトンで抽出する．
5．遠心分離後，2 回分の上清を合わせヘム粗抽出液とする．ヘムは塩酸アセトン中では比較的安定であり，少なくとも－20°C暗所で数日間保存することができる．
6．ヘム粗抽出液を 500 ml の分液漏斗に移し，30 ml のペルオキド・フリーのジエチルエーテル[注1]，100 ml の脱イオン水の順に分液漏斗に加え，混合する．
7．ヘム *b* はエーテル層に抽出される．エーテルによる抽出は 1 回で十分である．
8．エーテル層を濃縮フラスコに移し，ロータリーエバポレーターを用いて，22°C暗所で減圧濃縮を行い，1～2 ml まで濃縮する．高温や光照射下ではエーテル中にペルオキシドが生成されるため注意が必要である．
9．濃縮液を 10 ml の目盛り付き試験管に移す．濃縮フラスコを 2.5 ml のピリジン，そして 1～2 ml の脱イオン水で順に洗浄し，目盛り付き試験管に加える．（総量が 9 ml を越えないように加える洗浄水の量を調整する．）
10．すぐに定量しない場合には 5 °C暗所で保存する．

## 5.b.5　アルカリ-ピリジンヘモクロムの酸化還元差スペクトル測定によるヘムの定量

[実験方法]

1．ピリジン－ヘムを含む溶液に 1 ml の 1N NaOH を加え，脱イオン水で 10 ml に定容する．ピリジンの終濃度は 25%，NaOH の終濃度は 0.1 N となる．
2．暗所に放置後（1 時間以内），溶液を 2 本のキュベットに等量ずつ（～1.5 ml）加え，分光光度計（デュアルビーム型が望ましい）にセットする．
3．5 mg 程度の $K_3Fe(CN)_6$ の結晶を，リファレンス側のキュベットに加え，良く混合して完全に溶解させる．
4．10 mg 程度の $Na_2S_2O_4$[注2] の結晶を，サンプル側のキュベットに加え，転倒撹拌などにより穏やかに混合し溶解する．還元後，測定までに数分から数十分間放置する場合は，流動パラフィンなどを重層して酸素の浸透を防ぐ．スペクトル測定後，念のために再度 $Na_2S_2O_4$ を加え，再還元による吸収の増加がないことを確認すれば確実である．
5．535 nm～560 nm の吸収スペクトルを測定する．通常の条件では，吸光度のスケールは 0～0.1 の範囲

---

[注1] 試薬メーカーからはペルオキシド･フリーのジエチルエーテルが販売されているが，本論文では，エーテル中のペルオキシドを完全に取り除くため，ジエチルエーテルを 1/2～1/3 容の 5 %硫酸中 5 % $FeSO_4$(w/v) で 3 回洗浄し，終濃度0.1%のフェノールをペルオキシドのスカベンジャーとして加えている．このエーテルを 0 °C暗所で保管後，ヨウ化カリウム溶液を用いて完全にエーテル中のペルオキシドが除かれていることを確認してから，実験に供されている．論文中では以上の操作を行わないとヘムは完全に分解し，全く検出されていない．

[注2] $Na_2S_2O_4$ は大変分解しやすいため，新品の封を切った後は密閉できる容器に小分けにしておく．1 回蓋を開けたものは数日で使い終わるようにする．

に収まる．

6．557 nm と 541 nm における吸光度の差を求め，吸光係数 20.7 $mM^{-1}$ を用いて，ヘム *b* の濃度を定量する[17]．

7．ヘム *a* の濃度を求める場合は，ピリジンの終濃度を 90%とし，584 nm における $Na_2S_2O_4$ 還元による吸光度を求め，吸光係数 30.8 $mM^{-1}$ を用いて定量する[28,29]．

## 5.b.6　フェロキラターゼの活性測定法

ヘムの生合成（2.）でも述べたように，フェロキラターゼはプロトポルフィリン IX に $Fe^{2+}$ を配位させヘム *b* を合成する酵素である[21,30]．高等植物では，フェロキラターゼ活性は葉緑体に検出されている[31,32]．本酵素の活性測定にはプロトポルフィリン IX をはじめ，人工基質であるメソポルフィリン IX やデューテロポルフィリン IX が用いられ，精製したヘムのピリジンヘモクロムの酸化還元差スペクトルを測定することで行われる（表 3）[33]．基質である $Fe^{2+}$ の酸化を防ぐため，酵素反応はツンベルグ管を用いて行われる．図 3 にキュウリのフェロキラターゼ組換えタンパク質におけるデューテロヘム生成の経時変化を示す[34]．

[実験方法]

1．ツンベルグ管の反応管内に，50 μM デューテロポルフィリン IX 0.5% Triton X−100，2 mM ジチオトレイトール，100 mM Tris−HCl，pH 8.0，酵素抽出液を最終容量が 1 ml となるよう加える．

2．側管内に 100 μM $Fe^{2+}$-クエン酸塩を含む同緩衝液を 1 ml 入れる．

3．ツンベルグ管を，窒素置換を数回行いながら，真空ポンプで 2 〜 3 分間減圧下におく．

4．側管内の溶液を反応管内に移し，反応を開始する．

5．反応は 30℃で暗所下，30 分間浸とうする．

6．0.5 ml の 0.1 M ヨードアセトアミドを加えて反応を停止させ，0.5 ml ピリジンと 0.5 ml の 0.1 N NaOH を加える．

7．反応液を二分し，5．の実験操作 2 からに従って，酸化還元差スペクトルを測定する．

8．543 nm と 531 nm における吸光度の差を求め，吸光係数 15.3 $mM^{-1}$ を用いて，デューテロヘムの濃度を計算する．

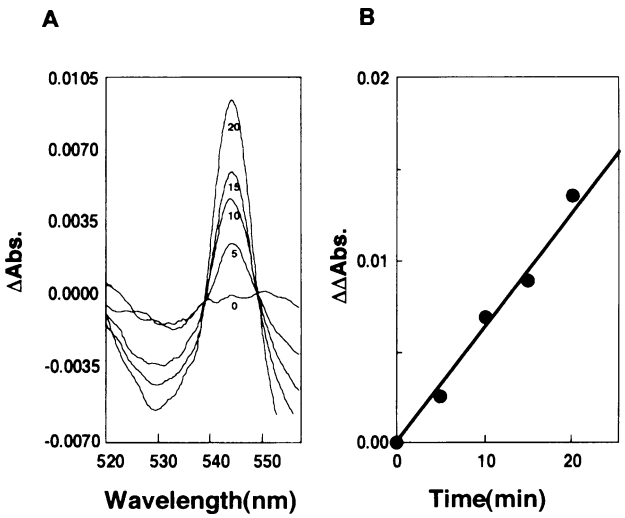



図 3：ピリジンヘモクロム法によるフェロキラターゼ活性の測定．キュウリフェロキラターゼ組換えタンパク質によるデューテロヘムの経時的生成．A：反応時間ごとの酸化還元差スペクトル．B：定量結果．

## 5.b.7　高速液体クロマトグラフィーによるヘムの定量

非共有結合性のヘムは，高速液体クロマトグラフィーにより分離し，400 nm 近辺の吸光度を分光検出器で検出することで，定量することが可能である．逆相の $C_{18}$ カラムを用い，展開溶媒に 0.5%トリフルオロ酢酸を含むアセトニトリルと 0.5%トリフルオロ酢酸を含む水の段階的な濃度グラジエント（30〜100%）で分離することにより，ヘム *a*，ヘム *b*，およびヘム *o* を検出している[5,35]．

植物のヘム分析については Weinstein と Beale により報告されている[36]．この方法では，ヘム *a* とヘム *b* の両方を同時に測定している．この論文では，DEAE 樹脂を用いてヘムの精製を行った後，高速液体クロマトグラフィーにサンプルをアプライしているが，この操作の必要性はそれぞれの実験条件によって判断されたい．分離は逆相カラムを用い，ヘムの検出には 402 nm の吸光度を測定している．

[実験方法]

1．先に述べた植物からのヘムの抽出操作の 8．まで行う．エーテル層は 0.2 ml 以下になるまで濃縮する．

2．ヘムを 0.1 ml のピリジンと 2 ml の酢酸に溶解後，0.5 ml のベッド容量の DEAE Sepharose CL-6B（酢酸型）カラムにアプライする．

3．DEAE カラムを 5 ml の酢酸，4 ml の 80%アセトンで洗浄することで，陽イオン性や中性の脂質を取り除く．

4．ヘムを 4 ml の 2 %（v/v）氷酢酸を含む 80%アセト

ンで溶出し，ロータリーエバポレーターで真空減圧濃縮し，乾固させる．

5．ヘムを66.5%エタノール／17%酢酸／16.5% 0.1 N アンモニア（v/v/v）に溶解する．まず，アンモニアに溶解してから，酢酸を加え，ヘムを溶解する．

6．Altex Ultrasphere ODS カラム（25 cm×4.6 mm，5 μm particle）を装着した高速液体クロマトグラムを用いる．展開溶媒は66.5%エタノール／17%酢酸／16.5%水（v/v/v）を用い，1 ml/min の流速で，カラム温度を30°Cで分離し，装着した分光検出器（402 nm）を用いて測定する．インジェクション容量は100 μl．

7．上記の実験条件で，ヘム *b* およびヘム *a* の保持時間は，それぞれ10.6 min および30.6 min である．それぞれのヘムの定量には双方の分画を回収し，ヘム *b* は398 nm の吸光度を測定し，吸光係数144 $mM^{-1}$ を用いて，またヘム *a* は406 nm の吸光度を測定し，吸光係数123 $mM^{-1}$ を用いて計算する．あるいはヘム *a*，ヘム *b* の標準物質のピークから検量線を作成し，濃度を求めても良い．

## 5.b.8 発色法などによるヘムの定量

先に述べたアルカリ-ピリジンヘモクロム法によるヘムの定量は，歴史的にも古くから行われており，操作に熟練すれば，ある程度高い再現性が得られている．しかし，操作が煩雑で，有機化学に縁のない生化学や分子生物学の実験室では，新たにガラス器具や実験装置を準備する必要がある．さらに，ペルオキシド・フリーのジエチルエーテルの調製に注意を要すること，有毒な溶媒であるピリジンをスペクトル測定時に使用すること，アルカリ-ピリジンヘモクロムのモル吸光係数が低いために，比較的多くの実験材料から抽出を開始する必要があることなど，微量サンプルを多検体測定したい場合には問題点が多い．

そこで，いくつかの発色法による定量法が報告されている[37–39]（表4）．その中で，Pandy ら[39] によるトリトン-メタノール発色法は簡便で，397 nm におけるモル吸光係数が165 という，アルカリ-ピリジンヘモクロム法より8倍程度高い感度を示している．この方法は，0.1 N NaOH に溶解したヘム20 μl と2.5% Triton X－100 を含むメタノール180 μl を混合し，405 nm の吸光度を測定するもので，96 ウェルのマイクロタイタープレート上で反応させ，マイクロプレートリーダーによる測定も可能である．示されている検量線によれば，$10^{-8}$～$10^{-5}$ モル濃度程度のヘムが直線性をもって定量できている．実際，ヘモグロビンを直接0.1 N NaOH に溶解し，希釈することで，直接ヘモグロビン中のヘムの定量に成功している．しかし，本方法はポルフィリンの Soret 帯の吸収を測定しているため，他のポルフィリンが混入している場合には，これらの影響を大きく受けると考えられる．実際，著者らが本法に従い測定すると，ヘム以外のプロトポルフィリン IX や Zn-プロトポルフィリン IX も高い吸収を示すことが認められた．従って，本方法でヘムを測定する場合には，調製するサンプルに注意が必要である．本方法に基づいたと思われるヘムの定量キット QuantiChrom™ Heme Assay Kit（DIHM－250）が BioAssay Systems より販売されており，日本ではフナコシより購入することができる[40]．

**表4**：分光学的手法によるヘム定量法の比較

| 測定方法 | 吸収極大波長 (nm) | ヘムの吸光係数 ($mM^{-1}$ $cm^{-1}$) |
|---|---|---|
| SDS 法 | 400 | 91 |
| トリトン-メタノール法 | 397 | 165 |
| ピリジンヘモクロム法 | 557 | 20.7 |
| Direct NaOH 法 | 385 | 58 |

また，ヘムのもつ偽ペルオキシダーゼ活性を利用して，ペルオキシダーゼ基質の発色を測定する方法が報告されている[41]．本方法では，市販のペルオキシダーゼ基質であるテトラメチルベンジジン（TMB）を基質としてヘムの定量を行い，トリトン-メタノール発色法よりも13.5 倍高い感度を得ている．しかし本方法は，ヘモグロビンや鉄などの偽ペルオキシダーゼ活性を持つ夾雑物の影響を受けやすいと考えられるため，測定するサンプルの調製には注意を要する．

## 5.b.9 酵素学的アッセイによるヘムの高感度定量法

最後に著者らが最近開発した，酵素学的アッセイによるヘムの定量法について紹介する．著者らは高等植物のヘム代謝に関する研究を行ってきており，モデル植物であるシロイヌナズナなど，小さな実験材料からヘムを定量する必要に迫られていた．そこで著者らは迅速，簡便で高感度なヘム定量系の開発を行った[42]．この方法は，1990 年の Thomas と Weinstein[43] が行った，ヘムの抽出液と西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）のアポタンパク質を混合することで，HRP 活性を自発的かつ定量的に再構成させ，発色法により検出するという手法を応用したもので，HRP 活性をルミノールの化学発光検出

により，さらに高感度かつ簡便に測定するものである．

本方法に従って，ルミノメーター（Turner design 社製，TD－20/20）を用いてヘムの標準溶液を測定すると，検出限界は 20 pM 程度であり，1 nM 程度まで直線性をもって定量することが可能であった．さらにこの反応はヘムに特異的であり，他のポルフィリンや金属ポルフィリンは全く HRP 活性を示さなかった．また，Fe(III) やヘムはそれ自身が偽ペルオキシダーゼ活性を持ち，ルミノール酸化活性を示すことから，ルミノール反応による血液の検出など警察の科学捜査などにも利用されている．そこで，Fe(III) やヘムのみが示す化学発光活性と比べたところ，同濃度のヘムで再構成した HRP 活性よりも 100 倍以上低いことが明らかとなり，これらの物質が共存しても，HRP 由来の化学発光には殆ど影響を与えないことが分かった．

一般に植物細胞には種や組織によっても異なるが，1～20 nmol/g 新鮮重程度のヘムが存在することが報告されている[27]．従って，先に述べた塩酸酸性アセトンによる抽出法に従い，1 g の植物体からヘムを抽出した場合，塩酸アセトンに含まれるヘムの濃度は，1～20 nmol/50 ml＝20～400 nM と計算できる．アセトンは HRP 活性を阻害するが，1％以下では殆ど活性を阻害しないことから，塩酸アセトン抽出液をバッファーで数百倍程度に希釈するだけで，HRP 活性に影響を与えない適度なヘム濃度の溶液を調製できることが分かった．実際，この方法で調製したヘム希釈液を用いて再構成した HRP 活性は十分検出可能であり，数 mg の植物体からでもヘム *b* の含量を測定することが可能であった．以上のことから，本方法はアセトン以外の有害な有機溶媒を用いず，しかも従来の測定法に比べて 100 倍以上の高感度で，夾雑物の影響を受けない，簡便かつ特異的なヘム定量法であることが明らかとなった．

その後，市販の化学発光によるウェスタンブロット検出試薬を用いて，検出感度の向上と試薬調製の手間の軽減を試みた．さらに，96 ウェルのマイクロタイタープレート上で反応させたサンプルの化学発光を，CCD カメラを内蔵したゲルドック内で測定することにより，多検体を同時測定することを可能にした[44]．現在，冷却 CCD を備えない旧式のゲルドックを用いて多検体を同時に測定しても，高い再現性と測定可能濃度の広いダイナミックレンジを実現している．実際，本測定法のヘムの検出感度は数 pM 以下にまで達し，さらに 1 nM 程度まで高い直線性を示している（図 4）．以下に最新の実験方法を紹介する．

**[実験方法]**

1．用意するべき試薬

(①) HRP アポザイム（APOHRP：Biozyme 社製，日本ではフナコシより購入可能）

(②) Hemin（どの試薬メーカーのものを用いても特に問題は無い．DMSO に溶解後，10 mM KOH で希釈して標準溶液を調製する[注3]．）

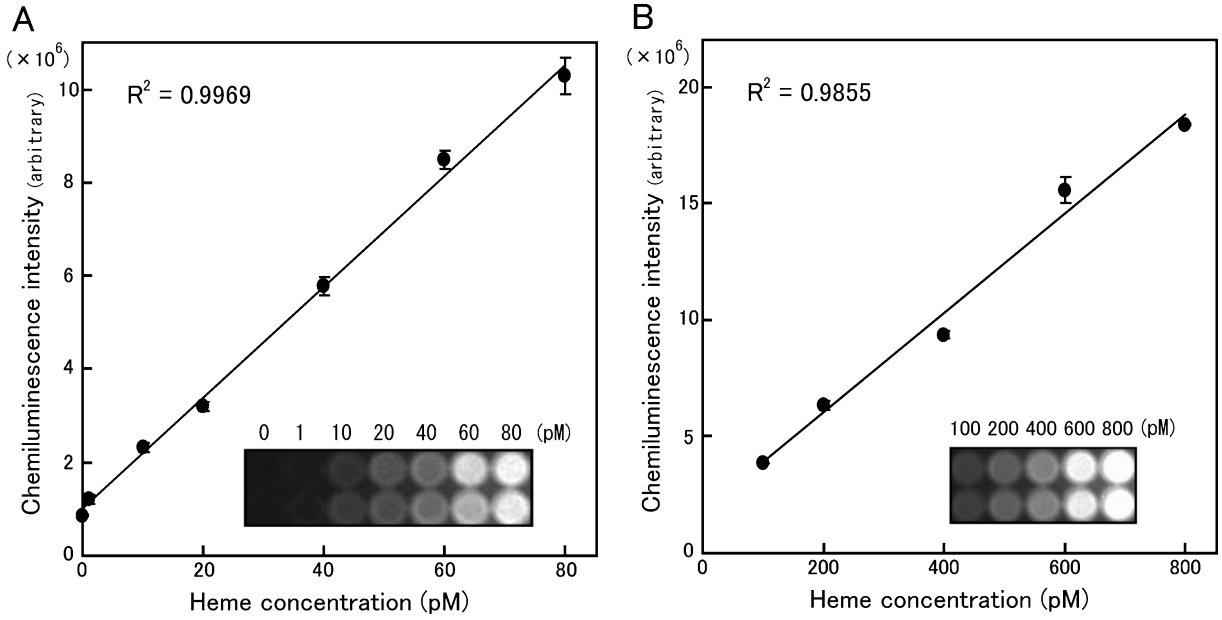



**図 4**：高感度定量法におけるヘムの検量線．A： 0～80 pM および B：100～800 pM のヘム濃度における検量線を示す．図表内の写真はゲルドックで撮影し，定量に供した化学発光を示す．それぞれの濃度範囲で高い直線性を示すことが分かる．

(③) Immobilon™ Western Chemiluminescent HRP Substrate（ミリポア社製[注4]）
(④) 500 mM Tris－HCl，pH 8.4

2．96 ウェルのマイクロタイタープレートの各ウェルに，終濃度 2.5 nM HRP アポザイム，100 mM Tris－HCl，pH 8.4，ヘム標準溶液（1～100 pM あるいは 100～1000 pM の濃度段階）を，最終容量 100 μl となるように混合する．
3．HRP の再構成のため，30 分間室温で放置する．
4．Immobilon のキットに含まれる 2 液を等量混合する．
5．各ウェルに 100 μl の混合した溶液を添加し，混合する．
6．化学発光は反応開始後 2 分程度で最大に達し，15 分間は最大発光が維持される．化学発光検出用のゲルドックあるいはマイクロプレート対応のルミノメーターで化学発光を検出する[注5]．
7．各ウェルの化学発光を定量し，検量線を作成する．
8．植物組織のヘム濃度を測定する場合は，先に述べた酸性アセトンによる抽出法を，実験のスケールを 100 分の 1 に下げ，実験操作 5．まで行う．得られた塩酸アセトン抽出液を数百倍程度，100 mM Tris－HCl, pH 8.4 で希釈し，実験に用いる[注6]．最近の我々の研究結果によると，不特定のヘムタンパク質が実験操作 1．のアンモニア性アセトンに溶解することが明らかとなった（未発表）．従って，植物組織中の総ヘム量を正確に定量するためには，アンモニア性アセトンによる抽出操作を省き，破砕を 80％アセトンで行うべきである．この条件ではヘムは抽出されない．

[注3] ヘムの濃度はアルカリ－ピリジン－ヘモクロム法で求めるか，66.5％エタノール／17％酢酸／16.5％水中でのヘムの 398 nm の吸光度を測定し，吸光係数 144 $mM^{-1}$ を用いて計算する．
[注4] GE Healthcare Bioscience 社の ECL Plus Western Blotting Detection System も同等の性能を有すると考えられる．
[注5] 測定感度は機器に応じて異なるため，それぞれの装置で調整する．浜松ホトニクス社製の ARGUS－50 を用いて測定を行った場合，integration frame の値を 100，bit range の値を 7～14 にセットすることで，安定して測定することが可能であった．
[注6] 本測定系は非常に感度が高いため，希釈率を誤るとヘム濃度は容易に検量線の範囲を越える．いくつかの希釈条件で測定を行い，濃度を確認する．またあまり高濃度のヘムを測定しようとすると，基質の枯渇による化学発光の kinetics の変化や，高発光による CCD 検出器の焼き付けなどを引き起こす場合があり得るので，注意する．

## 5.b.10 おわりに

これまでヘムは，ヘムタンパク質の補欠分子族として，酸化還元，電子伝達，そして酸素運搬として機能することが知られて来た．しかし近年ヘムが，動物，植物，微生物を問わず，多様な生理作用を調節する細胞内シグナルとしての機能することが明らかとなって来た．実際ヘムは，転写[45-47]，翻訳[48,49]，翻訳後のタンパク質輸送[50]，そしてイオンチャネルの制御[51] など，幅広い生理現象を調節することが報告されている．さらに細胞内オルガネラ間のヘム輸送が，赤血球形成に重要な役割を持つことが報告された[52,53]．植物細胞においても，ヘムはテトラピロール生合成系の負のフィードバック制御を担い，また緑藻クラミドモナスの転写制御シグナルとして機能することが報告されている[54]．ヘムの高次な役割の解明には，細胞内の各オルガネラにおける微量なヘム濃度を正確に測定する必要がある．実際，葉緑体においてヘム合成のフィードバック制御に関わる遊離ヘムのプールが存在するのか，またその濃度は？などについての知見は殆ど得られていない．特にシロイヌナズナなどの微小な生物材料におけるヘムの定量は難しく，植物体に 2,2'-dipyridyl などの鉄キレーターを処理することでフェロキラターゼ活性を阻害し，ヘムによるフィードバック制御を解除した材料におけるポルフィリン蓄積や ALA 合成活性を測定することで，ヘムの含量を間接的に見積もる方法がとられている[55,56]．しかしこの方法が遊離ヘムの濃度と相関するかどうかはいまだ明らかではなく，本方法のような直接的な定量が望ましいことは明らかである．

また簡便かつ高感度なヘム定量系は，マラリアの感染診断にも有用であることが示されている．ヒトに感染したマラリア原虫は，肝臓から赤血球に侵入した後，ヘモグロビンを分解しヘムを放出させる．この放出された遊離ヘムはマラリア感染による致死率と相関することから，血中のヘム濃度を調べることがマラリア感染診断の重要な指標と成り得ることが報告されている[57]．またマラリア原虫は遊離ヘムを多量体化してヘモゾイン（マラリア色素）とよばれる物質に変換することで，ヘムを無毒化している．現在マラリア治療に用いられているキニーネやアルテミシニンといった治療薬は，マラリア原虫細胞内でのこのヘム多量体化による無毒化のステップを阻害することで，作用することが知られている．従って，抗マラリア治療薬を開発する上でも，ヘムは良い指標になると考えられ，今後，微量のヘムを簡便かつ迅速に定量する技術は，ますます重要になっていくと考えられる．

ヘムは比較的不安定な物質であり，植物における微量分析などはこれまで殆ど成されて来なかった．今後，高感度なヘム測定の需要はますます増加していくことが予想され，著者らが開発した酵素学的アッセイによるヘムの高感度定量法がその一助になれば幸いである．

## 引用文献


1）E. Antonini & M. Brunori, Hemoglobin and Myoglobin in Their Reactions with Ligands. Amsterdam, Elsevier/North-Holland Biomedical Press, 1971
2）M. Sono, M.P. Roach, E.D. Coulter, & J.H. Dawson, Chem. Rev. **96** (1996), P.2841.
3）K.R. Rodgers, Curr. Opin. Chem. Biol. **3** (1999), P.158.
4）J. Sun, M. Brand, Y. Zenke, S. Tashiro, M. Groudine, & K. Igarashi, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **101** (2004), P. 1461.
5）M. Lubben & K. Morand, J. Biol. Chem. **269** (1994), P. 21473.
6）S.I. Beale, Photosynth. Res. **60** (1999), P.43.
7）I.U. Heinemann, M. Jahn, & D. Jahn, Arch. Biochem. Biophys. **474** (2008), P.238.
8）R. Tanaka & A. Tanaka, Annu. Rev. Plant Biol. **58** (2007), P.321.
9）S.P. Gough & C.G. Kannangara, Carlsberg Res. Commun. **44** (1979), P.403.
10）T. Masuda & Y. Fujita, Photochem. Photobiol. Sci. **7** (2008), P.1131.
11）M. Matringe, J.M. Camadro, P. Labbe, & R. Scalla, Biochem. J. **260** (1989), P.231.
12）T. Suzuki, T. Masuda, D.P. Singh, F.C. Tan, T. Tsuchiya, H. Shimada, H. Ohta, A.G. Smith, & K. Takamiya, J. Biol. Chem. **277** (2002), P.4731.
13）N. Watanabe, F.S. Che, M. Iwano, S. Takayama, S. Yoshida, & A. Isogai, J. Biol. Chem. **276** (2001), P.20474.
14）I. Lermontova, E. Kruse, H.-P. Mock, & B. Grimm, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **94** (1997), P.8895.
15）T. Masuda, T. Suzuki, H. Shimada, H. Ohta, & K. Takamiya, Planta **217** (2003), P.602.
16）R. Kranz, R. Lill, B. Goldman, G. Bonnard, & S. Merchant, Mol. Microbiol. **29** (1998), P.383.
17）J.-H. Fuhrhop & K.M. Smith, Porphyrins and Metalloporphyrins, ed. K.M. Smith, Amsterdam, Elsevier, 1975, p.757
18）The Porphyrins, ed. D. Dolphin, Vol.I～VII, New York, Academic Press. 1978～1979
19）L.M. Siegel, M.J. Murphy, & H. Kamin, Methods in Enzymology, ed. S.P. Colowick & N.O. Kaplan, Vol.52, New York, Academic Press, 1978, p.436
20）T. Inubushi & T. Yonetani, Methods in Enzymology, ed. E. Antonini & L. Rossi-Bernardi, Vol.76, New York, Academic Press, 1981, p.88
21）R.J. Porra & O.T. Jones, Biochem. J. **87** (1963), P.181.
22）S.Z. Hu, I.K. Morris, J.P. Singh, K.M. Smith, & T.G. Spiro, J. Am. Chem. Soc. **115** (1993), P.12446.
23）S.Z. Hu, K.M. Smith, & T.G. Spiro, J. Am. Chem. Soc. **118** (1996) P.12638.
24）堀洋，蛋白質科学会アーカイブ，**10** (2008), e037.
25）L. Min, N.V. Strushkevich, I.N. Harnastai, H. Iwamoto, A.A. Gilep, H. Takemori, S.A. Usanov, Y. Nonaka, H. Hori, G.P. Vinson, & M. Okamoto, FEBS J. **272** (2005) P.5832.
26）S. Takahashi, T. Ogawa, K. Inoue, & T. Masuda, Photochem. Photobiol. Sci. **7** (2008) P.1216.
27）L.C. Stillman & M.L. Gassman, Anal. Biochem. **91** (1978) P.166.
28）W.S. Caughey, G.A. Smythe, D.H. O'Keeffe, J.E. Maskasky, & M.I. Smith, J. Biol. Chem. **250** (1975) P. 7602.
29）L.J. DeFilippi & D.E. Hultquist, Biochim. Biophys. Acta. **498** (1977) P.395.
30）R.J. Porra & O.T.G. Jones, Biochem. J. **87** (1963) P.186.
31）R.J. Porra & J. Lascelles, Biochem. J. **108** (1968) P.343.
32）M. Matringe, J.M. Camadro, J. Joyard, & R. Douce, J. Bio. Chem. **269** (1994) P.15010.
33）S. Taketani & R. Tokunaga, J. Biol. Chem. **256** (1981) P.12748.
34）T. Suzuki, T. Masuda, H. Inokuchi, H. Shimada, H. Ohta, & K. Takamiya, Plant Cell Physiol. **41** (2000) P. 192.
35）N. Sone & Y. Fujiwara, J. Biochem. **110** (1991) P.1016.
36）J.D. Weinstein & S.I. Beale, J. Biol. Chem. **258** (1983) P. 6799.
37）T. Asakura, K. Minakata, K. Adachi, M.O. Russell, & E. Schwartz, J. Clin. Invest. **59** (1977) P.633.
38）R.M.C. Dawson, D.C. Elliot, W.H. Elliot, & K.M. Jones, Data for Biochemical Research, Oxford, Oxford Univ Press, 1986, p.230
39）A.V. Pandey, S.K. Joshi, B.L. Tekwani, & V.S. Chauhan, Anal. Biochem. **268** (1999) P.159.
40）K. Haldar, S.C. Murphy, D.A. Milner, & T.E. Taylor, Annu. Rev. Pathol. **2** (2007) P.217.
41）N.T. Huy, D.T. Xuan Trang, D.T. Uyen, M. Sasai, S. Harada, & K. Kamei, Anal. Biochem. **344** (2005) P.289.
42）T. Masuda & S. Takahashi, Anal. Biochem. **355** (2006) P.307.
43）J. Thomas & J.D. Weinstein, Plant Physiol., **94** (1990) P.1414.
44）S. Takahashi & T. Masuda, Comb. Chem. High Throughput Screen. (2008) in press.
45）L. Guarente & T. Mason, Cell **32** (1983) P.1279.
46）R.S. Zitomer & C.V. Lowry, Microbiol. Rev., **56** (1992) P.1.

47) Y. Shan, R.W. Lambrecht, T. Ghaziani, S.E. Donohue, & H.L. Bonkovsky, J. Biol. Chem. **279** (2004) P.51769.
48) J.J. Chen, J.M. Yang, R. Petryshyn, N. Kosower, & I. M. London, J. Biol. Chem. **264** (1989) P.9559.
49) B. Joshi, S.J. Morley, R.E. Rhoads, & V.M. Pain, Eur. J. Biochem. **228** (1995) P.31.
50) J.T. Lathrop & M.P. Timko, Science **259** (1993) P.522.
51) X.D. Tang, R. Xu, M.F. Reynolds, M.L. Garcia, S.H. Heinemann, & T. Hoshi, Nature **425** (2003) P.531.
52) J.G. Quigley, Z.Yang, M.T. Worthington, J.D. Phillips, K.M. Sabo, D.E. Sabath, C.L. Berg, S. Sassa, B.L. Wood, & J.L. Abkowitz, Cell **118** (2004) P.757.
53) A. Rajagopal, A.U. Rao, J. Amigo, M. Tian, S.K. Upadhyay, C. Hall, S. Uhm, M.K. Mathew, M.D. Fleming, B.H. Paw, M. Krause, & I. Hamza, Nature **453** (2008) P.1127.
54) E.D. von Gromoff, A. Alawady, L. Meinecke, B. Grimm, & C.F. Beck, Plant Cell **20** (2008) P.552.
55) M. J. Terry & R. E. Kendrick, Plant Physiol. **119** (1999) P.143.
56) J. Moon, L. Zhu, H. Shen, & E. Huq, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **105** (2008) P.9433.
57) A. Ferreira, J. Balla, V. Jeney, G. Balla, & M.P. Soares, J. Mol. Med. **86** (2008) P.1097.

# 5．色素の分析
## c．バクテリオクロロフィルの分析

民秋　　均[1)]，溝口　　正[2)]

バクテリオクロロフィルは，光合成アンテナや反応中心において，光収穫・エネルギー伝達や電子移動を行う光応答性の色素分子である．本章では酸素非発生型光合成細菌からのバクテリオクロロフィルの抽出・分析方法について紹介する．

## Analysis of Bacteriochlorophylls

Hitoshi Tamiaki, Tadashi Mizoguchi

Bacteriochlorophylls are photoactive pigments in photosynthetic antennas and reaction centers where light-harvesting, energy-transferring and electron-transferring processes occur.　In this chapter, we describe analytical methods of bacteriochlorophylls in anoxygenic photosynthetic bacteria.　variety of bacteriochlorophylls, their biosynthesis and principle of their analysis are also described.

### 5.c.1　バクテリオクロロフィルの種類

バクテリオクロロフィルは，酸素非発生型光合成細菌から見出されたクロロフィルに名付けられている．そのような光合成細菌にあるクロロフィル類は，主としてバクテリオクロロフィルであるが，一部マイナーなクロロフィル（緑色硫黄細菌やヘリオバクテリアの反応中心における一次電子受容体）には，酸素発生型光合成生物に見出されるクロロフィル *a* の誘導体として名付けられているものも有るので注意しましょう．

バクテリオクロロフィルには，*a* から *g* までの7種類が有り，これまで *f* を除く6種類が確認されている（バクテリオクロロフィル *f* は名前が予約されているだけで，天然界からは発見されていない）．17位上のプロピオネート残基における長鎖炭化水素基の多様性を除けば，バクテリオクロロフィル *a*，バクテリオクロロフィル *b*，バクテリオクロロフィル *g* は，B・D両環の $\beta$ 位の炭素―炭素二重結合が単結合に還元されたバクテリオクロリン骨格を有する単一の分子構造を示し，バクテリオクロロフィル *c*～*f* は，D環のみが還元されたクロリン骨格を有する同族体分子の総称である（図1）[1)]．名称と $\pi$ 骨格とが一致しない（クロリン骨格を有するバクテリオクロロフィルが存在する）ので，混乱しないように心掛けるべきである．酸素非発生型光合成細菌から単離されたクロロフィル型分子に，バクテリオクロロフィルという名称が与えられているのであって，バクテリオクロリン骨格を有する化合物にバクテリオクロロフィルという名称が与えられている訳ではないことを，再確認しましょう．

まず17位上の長鎖エステル基の多様性を無視して，バクテリオクロロフィルの分子構造について簡単に説明しましょう．バクテリオクロロフィル *a* は多くの紅色細菌に見られるが（表1），その8位と $8^1$ 位から各1個の水素原子を除いて（*E*）-8-エチリデン基になったものが，バクテリオクロロフィル *b* である（図1）．バクテリオクロロフィル *b* も一部の紅色細菌から見出されているが，その天然界における分布はさほど多くない．バクテリオクロロフィル *b* の3-アセチル基をビニル基にしたものが，ヘリオバクテリアで見出されたバクテリオクロロフィル *g* である．好酸性紅色細菌の中にはバクテリオクロロフィル *a* の中心金属がマグネシウムから亜鉛に置き変わったものも有り，亜鉛バクテリオクロロフィル *a* と呼ばれている．

バクテリオクロロフィル *c* は多くの緑色細菌に見られるが，その20位のメチル基を水素原子に置き換えたものがバクテリオクロロフィル *d* に，その7位のメチル基をホルミル基に置き換えたものがバクテリオクロロフィル *e* になる．なお，バクテリオクロロフィル *e* の20位脱メチル体がバクテリオクロロフィル *f* という名前で予約されている．バクテリオクロロフィル *c*～*e* は，$8^2$ や $12^1$ 位上でのメチル化度が異なる同族体の総称であり，これまで8位にエチル・プロピル・イソブチル・ネオペンチル基が，12位にメチル・エチル基が見出されている．

1）立命館大学総合理工学院薬学部薬学科
2）立命館大学総合理工学院生命科学部応用化学科

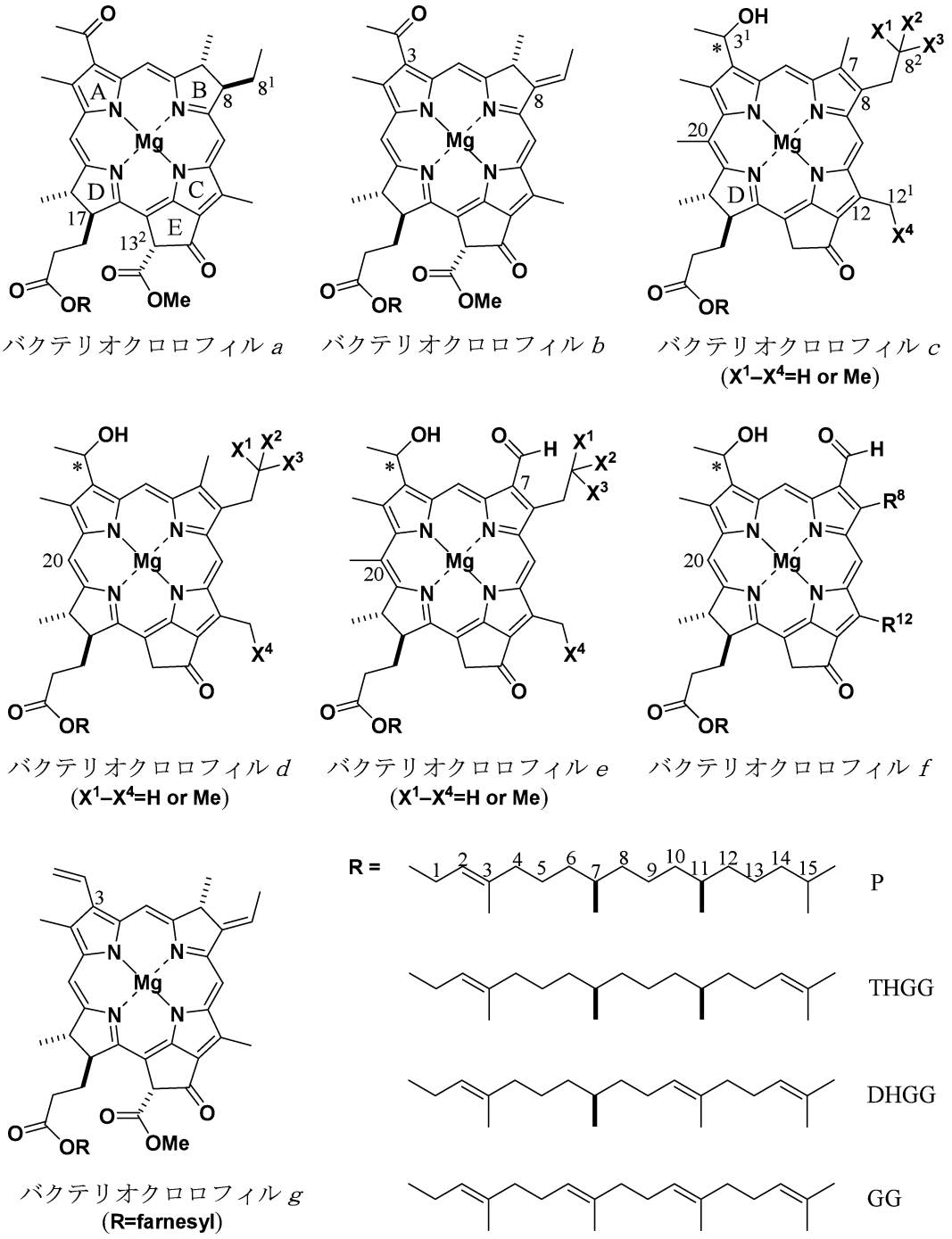



図1：バクテリオクロロフィル *a*～*g* の分子構造

さらに，それぞれの同族体において，$3^1$ 位の不斉炭素原子に関して立体構造の異なるもの（*R* 体と *S* 体）が存在することも多い．

17 位上の長鎖エステル基は，バクテリオクロロフィル *a* やバクテリオクロロフィル *b* では通常フィチル基（P）である．種によってはその生合成途上のゲラニルゲラニル（GG）・ジヒドロゲラニルゲラニル（DHGG）・テトラヒドロゲラニルゲラニル（THGG）もみられることがある（図 1）[2]．バクテリオクロロフィル *g* ではファルネシル基しかこれまで見つかっていない．緑色硫黄細菌のバクテリオクロロフィル *c*～*e* では，主としてファルネシル基であるが，それ以外の多様な炭化水素基も見出されている．緑色非硫黄細菌のバクテリオクロロフィル *c* では，上記の分枝炭化水素基以外に，ステアリルやオレイル基のような直鎖状のものまでが見られる．

バクテリオクロロフィルの中心金属を除いたもの

**表1**：バクテリオクロロフィルの種類および存在する器官と生物種

| バクテリオクロロフィル類 | 光合成器官 | 生物種 |
|---|---|---|
| バクテリオクロロフィル *a* | LH1，LH2，LH3，LH4，RC（紅色細菌） | 紅色細菌 |
| | ベースプレート，FMO，RC 複合体（緑色硫黄細菌） | 緑色細菌 |
| | ベースプレート，膜内アンテナ，RC（緑色非硫黄細菌） | |
| バクテリオクロロフィル *b* | LH1，RC | 紅色細菌 |
| バクテリオクロロフィル *c* | クロロゾーム | 緑色細菌 |
| バクテリオクロロフィル *d* | クロロゾーム | 緑色硫黄細菌 |
| バクテリオクロロフィル *e* | クロロゾーム | 緑色硫黄細菌 |
| バクテリオクロロフィル *f* | 未発見 | |
| バクテリオクロロフィル *g* | RC 複合体 | ヘリオバクテリア |
| 亜鉛バクテリオクロロフィル *a* | LH1，LH2，RC | 好酸性紅色細菌 |
| バクテリオクロロフィル *a*’ | RC の一次電子供与体（緑色硫黄細菌） | 緑色硫黄細菌 |
| バクテリオクロロフィル *g*’ | RC の一次電子供与体（ヘリオバクテリア） | ヘリオバクテリア |
| バクテリオフェオフィチン *a* | RC の一次電子受容体（紅色細菌） | 紅色細菌 |
| | RC の一次電子受容体とアクセサリー部（緑色非硫黄細菌） | 緑色非硫黄細菌 |
| バクテリオフェオフィチン *b* | RC の一次電子受容体（紅色細菌） | 紅色細菌 |

（フェオフィチン化）を，バクテリオフェオフィチンと呼び，紅色細菌や緑色非硫黄細菌の PS 2 型の反応中心における一次電子受容体として機能している（表 1）．また，バクテリオクロロフィルの 17 位上のプロピオネート残基のエステルを加水分解して得られるカルボン酸体を，バクテリオクロロフィリドと呼び，このようなカルボン酸が生合成途上で見られる．さらに，13² 位の不斉炭素原子における立体異性体（エピマー体）をプライム体と呼び，「’」を名称の後に付ける．バクテリオクロロフィル *a*’ とバクテリオクロロフィル *g*’ が，緑色硫黄細菌とヘリオバクテリアの PS 1 型の反応中心における一次電子供与体にあるとされている（表 1）[3]．

バクテリオクロロフィル *a*・*b*・*g* は，オリゴペプチドと非共有結合して，バクテリオクロロフィル－タンパク複合体を形成しており，その中心マグネシウムはアキシャル位から配位を受けて，必ず五配位錯体となっている．この第五配位子は，オリゴペプチド中のヒスチジン残基のイミダゾール基であることが多いが，それ以外の残基や水分子などの場合も有る[4]．バクテリオクロロフィル *c*～*f* は，自己集積して巨大な J 会合体を形成しており，その中心マグネシウムは隣接分子の 3¹ 位の水酸基の酸素原子のアキシャル位配位を受けている[5]．いずれのバクテリオクロロフィルでも天然界では，中心マグネシウムは五配位型であり，四配位や六配位錯体では存在していないことに注意しましょう[6]．

## 5.c.2　バクテリオクロロフィルの生合成

ヘムやクロロフィルと共通して，プロトポルフィリン Ⅸ が生合成経路における前駆体となる（図 2）．マグネシウムを中心に挿入し，13 位上でのプロピオネート残基のメチルエステル化とそれに続く嫌気下でのオキソ化とエキソ五員環形成によって，（3,8-）ジビニルプロトクロロフィリド *a* が合成される．ここまでは，酸素発生型光合成で見られるクロロフィル *a*・*b* と同じである．この後，どのような経路でバクテリオクロロフィルを合成されるのかは，いくつかの経路が提唱されており，まだ確定していない[7–10]．以下に，ジビニルプロトクロロフィリド *a* からバクテリオクロロフィリドに至る酵素による官能基変換を列挙する（図 2）．

1）3-ビニル基は，マルコフニコフ型で水分子の付加を受け 1-ヒドロキシエチル基になり，さらに酸化されることでアセチル基に変換される．
2）7 位のメチル基が酸化されて，ホルミル基になる．
3）7-8 位の二重結合がトランス型で「水素分子」の付加（還元）を受ける．
4）8-ビニル基は還元を受けてエチル基になり，その末端のメチル基の水素原子が順次メチル化されることで，プロピル・イソブチル・ネオペンチル基へと変換される．また，7-8 位の二重結合と共役した 8-ビニル基は，1,4-水素付加（還元）を受けて 8-エチリデン基に変換されうる．8-エチリデン基は，7-8 位の二重結合の還元後の 8-ビニル基の異性化によって合成される可能性と，7-8 位の二重結合と 8-ビニル基の両方の還元後に 8 位と 8¹ 位の水素脱離（脱水素・酸化）によって合成される可能性が有る．
5）12 位のメチル基の水素原子がメチル化されて，エチル基になる．
6）13² 位のメトキシカルボニル基が加水分解を受けてカルボキシ基となり，さらに脱炭酸して水素原子にな

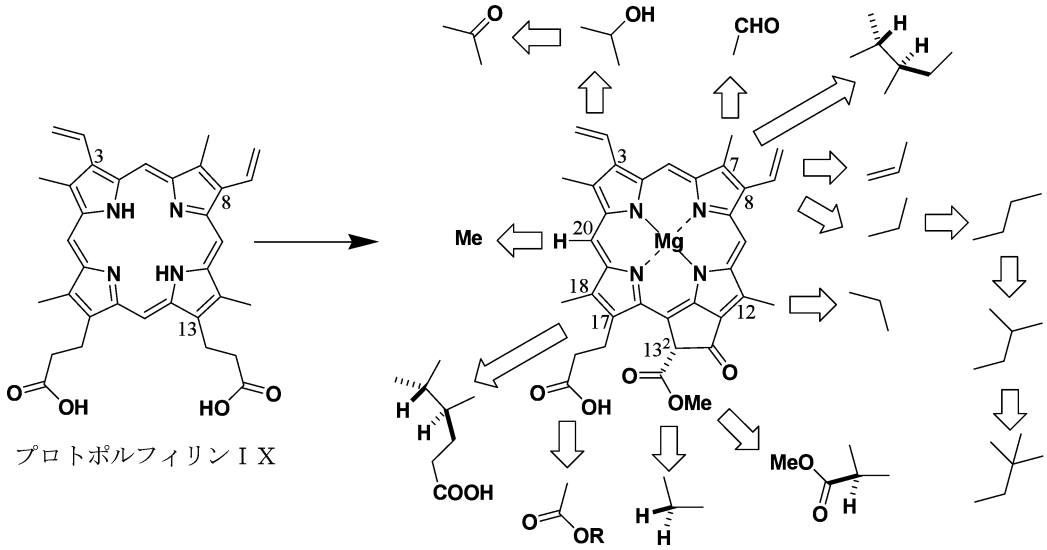



**図 2**：バクテリオクロロフィルの生合成経路（官能基変換）

る．$13^2$ 位のメトキシカルボニル基の立体配置が反転して，立体異性体（エピマー体・プライム体）になる．

7）17-18 位の二重結合がトランス型で水素付加（還元）を受ける．

8）20 位の水素原子がメチル化される．

9）中心金属のマグネシウムが亜鉛に置き変わったり，2 個の水素原子に置き変わったりする．

以上のようにして生合成されたバクテリオクロロフィリドは，エステル化されてバクテリオクロロフィルとなる．なお，エステル化後にエステル上の炭素―炭素二重結合が還元されるのか，予め還元されたエステル化剤でエステル化されるのかもはっきりしていない．どちらか一方が起こるのではなく，そのどちらもが起こる可能性も否定されていない．

## 5.c.3　バクテリオクロロフィル分析の原理

各バクテリオクロロフィルは，中心マグネシウムへの配位が可能な有機溶媒中（例えばアセトンやエーテル）では，単量体として存在し，その固有の性質を与える（表 2）．特に近赤外・可視・紫外領域での電子吸収スペクトルがその同定には大きな威力を発揮する．一方，低極性有機溶媒や水中では容易に自己集積して，その吸収スペクトルが大きく変化する．

バクテリオクロロフィルの吸収スペクトルは，長波長側から，$Q_y$・$Q_x$・$B_y$・$B_x$ の 4 つの吸収帯があり，それぞれに振動構造を有している．$B_y$・$B_x$ 帯をまとめてソーレー（Soret）帯と呼ぶことも多い．バクテリオクロリン骨格を有するバクテリオクロロフィル *a*・*b*・*g* は，近赤外領域に大きな $Q_y$ 帯と可視領域に少し小さいがはっきりとした $Q_x$ 帯と近紫外領域に大きくて分裂したソーレー帯を有している．クロリン骨格を有するバクテリオクロロフィル *c*～*e* は，可視領域に大きな $Q_y$・ソーレー帯ときわめて小さい $Q_x$ 帯を有している．

バクテリオクロロフィルの吸収帯は，環状テトラピロールの π 共役系に基づいているために，π 系に直結した置換基の影響を大きく受ける．このために，各バクテリオクロロフィルは固有の吸収スペクトルを与える．つまり，単離したバクテリオクロロフィルの適当な有機溶媒中での吸収スペクトルを測定すれば，その同定が可能である．一方，π 系から離れた $8^2$ や $12^1$ 位上でのメチル基の数や 17 位上のエステル基の違いや $3^1$ 位の立体構造は，ほとんどその吸収スペクトルに変化を与えない．そこで各バクテリオクロロフィルにおけるこのような差異は，吸収スペクトルからでは区別できない．質量分析や核磁気共鳴法などを利用して，その分子構造を決定することになる．

バクテリオクロロフィルは，生体系では比較的安定であるが，有機溶媒中の単量体では化学的に比較的不安定である．従って，その分離・分析には注意を要するが，近年では高速液体クロマトグラフィー（HPLC）法を用いれば，初学者でも比較的容易に分離・同定が行える．検出に吸収スペクトル測定が可能なフォトダイオードアレイ型の検出器を用いれば，分離同定が一度に出来て便利

**表2**：バクテリオクロロフィルのジエチルエーテル中での吸収極大 $\lambda_{max}$(nm) と吸光係数 $\varepsilon$ ($mM^{-1}cm^{-1}$)

| バクテリオクロロフィル類 | | ソーレー帯 | $Q_x$ 帯 | $Q_y$ 帯 | 文献 |
|---|---|---|---|---|---|
| バクテリオクロロフィル *a* | $\lambda_{max}$ | 358 | 577 | 773 | 11 |
| | $\varepsilon$ | | | 90.0 | |
| | $\lambda_{max}$ | 357 | | 771 | 12 |
| | $\varepsilon$ | 75.3 | | 97.0 | |
| バクテリオクロロフィル *b* | $\lambda_{max}$ | 368 | 578 | 794 | 11 |
| | $\varepsilon$ | | | 106 | |
| | $\lambda_{max}$ | 372 | | 791 | 12 |
| | $\varepsilon$ | 77.2 | | 106 | |
| バクテリオクロロフィル *c* | $\lambda_{max}$ | 429 | | 659 | 11 |
| | $\varepsilon$ | | | 112.5 | |
| | $\lambda_{max}$ | 429 | | 660 | 12 |
| | $\varepsilon$ | 112 | | 73 | |
| バクテリオクロロフィル *d* | $\lambda_{max}$ | 423 | | 651 | 11 |
| | $\varepsilon$ | | | 113.5 | |
| | $\lambda_{max}$ | 423 | | 651 | 12 |
| | $\varepsilon$ | 117 | | 88.3 | |
| バクテリオクロロフィル *e** | $\lambda_{max}$ | 458 | | 647 | 11，12 |
| | $\varepsilon$ | 100 | | 34 | |
| バクテリオクロロフィル *g* | $\lambda_{max}$ | 364，404 | 565 | 767 | 11 |
| | $\lambda_{max}$ | 364 (0.94)# | | 767 (1.00)# | 12 |
| 亜鉛バクテリオクロロフィル *a* | $\lambda_{max}$ | 353 (0.80)# | | 763 (1.00)# | 12 |
| バクテリオフェオフィチン *a* | $\lambda_{max}$ | 358 | | 749 | 12 |
| | $\varepsilon$ | 114 | | 67.5 | |
| バクテリオフェオフィチン *b* | $\lambda_{max}$ | 398 | | 776 | 12 |
| | $\varepsilon$ | 237 | | 100 | |

* アセトン中，# 相対吸光強度．

である．さらに，蛍光発光による検出法を用いれば，高感度な分析が可能であり，質量分析を検出に用いるLC-MS法を用いれば，高感度分析の上に，エステル鎖や同族体の決定にも威力を発揮する．なお，$3^1$位の立体構造は，誘導体の結晶構造解析によって決定できるが，これまでの多くの分析結果に基づき，HPLCの溶離順によってほぼ確定できる（5.c.6参照）．

## 5.c.4 光合成細菌からのバクテリオクロロフィルの抽出法

酸素非発生型光合成細菌は，自然から単離精製するか研究室のストックや各種団体からの分与によって入手することになる．この種菌をゲルや液体培地で培養して増殖してから，バクテリオクロロフィルを抽出することになる．いずれの場合でも，コロニー形成による精製を行っておいた方が，微量バクテリオクロロフィルの分析には安心である．

通常は，液体培地で培養後に，菌体を遠心沈降によって分離し，そのウエットセルから抽出することになる．以下に菌体からのバクテリオクロロフィルの抽出法を述べる．

光合成細菌からのバクテリオクロロフィルの抽出法は，利用可能な溶媒・器具等により様々であるが，本稿では一般的な化学系実験室で可能な方法について記述する．なお，バクテリオクロロフィルを変性させる外部因子として，光・熱・酸素があげられる．必要に応じこれらの因子の低減を心がけるべきである．

**(1) 少量の抽出**（吸収スペクトル測定，HPLC分析）

器具＝卓上型遠心分離器(あると便利)，キャップ付き試験管

試薬・溶媒＝アセトン，メタノール，ジエチルエーテル，飽和食塩水，窒素ガス

操作①：培養液5 mL程度を遠心沈降し，ウエットセルを得る（1000 g程度を発生させる卓上型遠心器で十分に沈降できる）．卓上型遠心器が無い場合は，培養液(1 mL程度）そのものを用いて以下の操作を行うことも可能である．バクテリオクロロフィルは脂溶性であるため，水の割合（培養液量）が増えると抽出効率が悪くなる．必要に応じて，溶媒量を調節すること．

操作②：ウエットセルに，アセトン／メタノール混合溶液（≒1：1(v/v)）(2 mL）を加え，よく撹拌する（超音波照射等の激しい破砕を行わなくても十分抽出され

る)．

操作③：再度遠心分離し，上清画分を回収する（ろ過により残渣を除去してもよい)．

操作④：回収した上清画分（アセトン／メタノール混合溶液＋微量の水)に同量のエーテルを加え(2 mL)，更に（蒸留）水を加えて色素をエーテル層に抽出する．

操作⑤：エーテル層は，飽和食塩水を用いて脱水・洗浄する．

操作⑥：エーテル層を回収し，窒素ガス気流などで溶媒を留去後，目的の溶媒に再溶解し，種々の測定・分析に用いる．

以上の操作は数分間で十分行えるので，通常の白色蛍光灯下で作業しても大抵のバクテリオクロロフィルは安定に抽出できる．

### (2) 大量の抽出

原理的には上記(1)の少量での抽出と同じである．作業時間が幾分長くなるので，各操作中，容器をこまめに遮光することを心がけること．

器具＝磁気撹拌器，三角フラスコ，分液ろうと，ロータリーエバポレータ

試薬・溶媒＝アセトン，メタノール，ジエチルエーテル，飽和食塩水，無水硫酸ナトリウム，窒素ガス

操作①：ウエットセルにアセトン／メタノール混合溶液を加え，磁気撹拌器を用いてよく撹拌する．必要に応じて（特にバクテリオクロロフィル *b* や *g* などの空気酸化が起こりやすい試料の場合)，窒素ガスを通気した窒素雰囲気下で行うことで試料の変性が低減される．

操作②：デカンテーションにて溶液を回収し，残渣に対して①と同様の操作を色素が抽出されなくなるまで行う．

操作③：アセトン／メタノールの抽出液を混合し，エーテルと（蒸留）水で分液・洗浄する．

操作④：エーテル層は飽和食塩水で脱水・洗浄し，無水硫酸ナトリウムを加え 15 分以上脱水する．

操作⑤：ロータリーエバポレータを用いて溶媒を留去する．

試料の保存は，乾燥状態の場合，窒素ガスを封入し(空気による酸化に注意)，冷凍保存する．溶液保存の場合は，ジエチルエーテルやアセトン等を溶媒として用い冷凍保存する．いずれの保存法でも容器は遮光しておく．バクテリオクロロフィルの変性を誘起する因子（光・熱・酸素）を低減させれば，長時間，安定に保存できる（年単位での保存も可能)．

### (3) 単離・精製法

上記の抽出操作では，目的のバクテリオクロロフィル以外にカロテノイド色素も抽出されるので，カラムクロマトグラフィーや再結晶等による精製が必要となる．その精製時における注意点を下記に示す．

- 一般的に市販されているシリカゲルによるバクテリオクロロフィルの単離は，試料の変性を誘起しやすいため困難である（固定相であるシリカゲルが酸性であるため)．
- バクテリオクロロフィルの単離に適した固定相としては，Sepharose（アガロース）やセルロースがあげられる．Sepharose は，幾分高価であるが分離能は極めて高い．一方，セルロースは，安価であるが分離能の点で Sepharose に劣る．
- 緑色細菌に含まれるバクテリオクロロフィル *c*〜*e* に関しては，ヘキサン等の無極性溶媒への溶解度が低いので，再結晶により単離が容易に行える．

なお，十分に純度の高いバクテリオクロロフィルを得るためには，5.c.6 で述べる HPLC を利用する必要が有る．

## 5.c.5 吸収スペクトル測定によるバクテリオクロロフィルの同定

一般的なダブルビーム型分光光度計を用いた同定法を以下に記述する．

光合成細菌に含まれるバクテリオクロロフィルは，それらに固有の吸収帯を有しているので，吸収スペクトルから容易に同定が行える（表 2)．特に最長波長吸収帯である $Q_y$ 帯は，バクテリオクロロフィルの種類により大きな差があるので，識別に適している．測定に用いる溶媒は，ジエチルエーテルやアセトン等が一般的で，これらの溶媒中でのモル吸光係数も決定されているので便利である．溶媒の吸収にも配慮し，使用する溶媒を選定する（アセトンは紫外部に吸収を有すため，350 nm よりも短波長領域での測定は出来ない)．バクテリオクロロフィル *a*・*b*・*g* では，$Q_x$ 帯の吸光度も大きいので，色素の同定に有効である．特に，脱マグネシウム化したか否かの確認（あるいはバクテリオフェオフィチンの生成）の際に威力を発揮する．緑色細菌のバクテリオクロロフィル *c*〜*e* では，$Q_x$ 帯の強度が低いので，ソーレー帯によるフェオフィチン化の識別が有効である($Q_y$ 帯に比べ波長の変化が大きく識別が容易)．バクテリオクロロフィルは，大きなモル吸光係数を有すため，目視にて着色が確認できる程度の濃度(μM オーダー)で十分測定可能であ

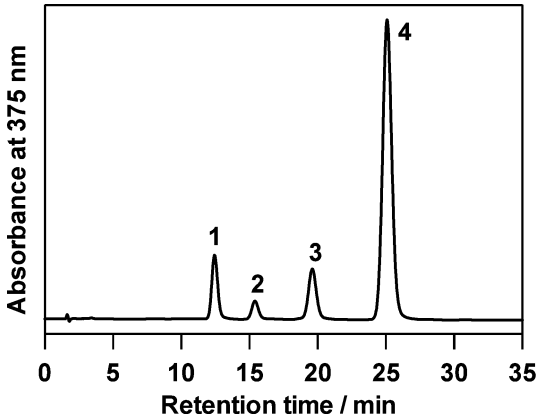



図3：紅色光合成細菌のバクテリオクロロフィル *a* の逆相HPLC分析例.
1：ゲラニルゲラニルエステル
2：ジヒドロゲラニルゲラニルエステル
3：テトラヒドロゲラニルゲラニルエステル
4：フィチルエステル
Cosmosil 5C18-AR-II(4.6 x 150 mm)，7.5%(v/v) 水－メタノール，1.0 mL/min[2].

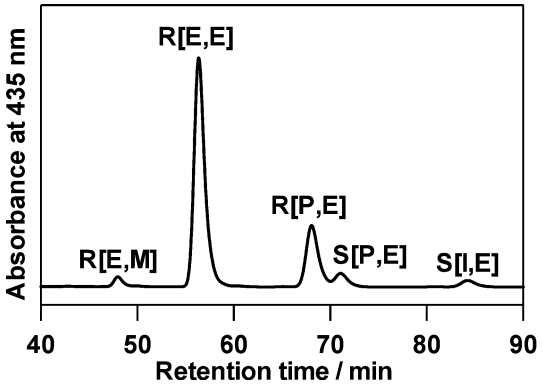



図4：緑色光合成細菌のバクテリオクロロフィル *c* の逆相HPLC分析例.
R[E,M]：(3¹*R*)-8-エチル-12-メチル体
R[E,E]：(3¹*R*)-8-エチル-12-エチル体
R[P,E]：(3¹*R*)-8-プロピル-12-エチル体
S[P,E]：(3¹*S*)-8-プロピル-12-エチル体
S[I,E]：(3¹*S*)-8-イソブチル-12-エチル体
Cosmosil 5C18-AR-II(4.6 x 150 mm)，10%(v/v) 水－メタノール，0.5 mL/min[13].

る．バクテリオクロロフィル *a*・*b*・*g* の場合，可視部の吸収が弱いので注意を要する（容易に吸収が飽和する）．

## 5.c.6 HPLCによるバクテリオクロロフィルの同定

HPLCのための注入試料の調製は次の通りである．まず，抽出・単離したバクテリオクロロフィルを，HPLCで使用する移動相溶媒に置換する．0.45 $\mu$m の細孔径を有すフィルターでろ過後，HPLCに注入する．ろ過フィルター以外にも多種の前処理カートリッジが市販されているので，カロテノイド色素の除去に便利である．

大部分のバクテリオクロロフィルは，メタノール／水（10%程度）の混合溶媒を用いた逆相系HPLCにより容易に分離・同定が行える．オクタデシルシリル（ODS）カラムを固定相とした逆相HPLCによる分離・同定について以下に記述する．

- バクテリオクロロフィル *a*・*b* では，17位の長鎖エステルの微細な構造の違いも分離可能である（図3）[2]．また，バクテリオクロロフィル *a* とその13²位における光学異性体のバクテリオクロロフィル *a*'の分離も簡単に行える．
- 緑色細菌に含まれるバクテリオクロロフィル *c*～*e* では，8位および12位のアルキル基におけるメチル化度の異なる一連の同族体の分離も可能である[13]．メチル化度が高い化合物ほど，その脂溶性が高くなるので逆相系HPLCでは溶出が遅くなる(図4)．また，3¹位における光学異性体（*R* または *S* 型）も分離ができ，*R* 型配置の方が溶出は早い（図4）．

バクテリオクロロフィルの順相系HPLC分析では，用いるカラム（＝シリカゲル）の酸性度に注意が必要である．バクテリオクロロフィル *b*・*g* では，分析中に容易にB環の異性化が生じクロロフィル誘導体へと変性する．また，ヘキサン等の無極性溶媒がベースとなるため，緑色細菌のバクテリオクロロフィル *c*～*e* に対しては，溶解度が低いため，不向きと言える．

## 参考文献


1）H. Tamiaki, R. Shibata & T. Mizoguchi, *Photochem. Photobiol*. **83** (2007) P.152.
2）T. Mizoguchi, J. Harada & H. Tamiaki, *FEBS Lett*. **580** (2006) P.6644.
3）小林正美，大橋俊介，光合成微生物の機能と応用（上原赫監修），第1章の3，シーエムシー出版，2006.
4）T. Oba & H. Tamiaki, *Photosynth. Res*. **74** (2002) P.1.
5）H. Tamiaki, *Coord. Chem. Rev*. **148** (1996) P.183.
6）民秋　均，*金属錯体の光化学*（佐々木陽一・石谷　治編著），13章，三共出版，2007.
7）T. Masuda & Y. Fujita, *Photochem. Photobiol. Sci*. **7** (2008) P.1131.
8）R. D. Willows & A. M. Kriegel, *The Purple Phototrophic Bacteria* (C. N. Hunter, F. Daldal, M. C. Thurnauer & J. T. Beatty, ed.) [*Adv. Photosynth. Respiration* 28], Chapter 4, Springer, 2009.
9）N.-F. Frigaard, A. G. M. Chew, J. A. Maresca & D. A.

Bryant, *Chlorophylls and Bacteriochlorophylls* (B. Grimm, R. J. Porra, W. Rüdiger & H. Scheer, ed.) [*Adv. Photosynth. Respiration* 25], Chapter 15, Springer, 2006.
10) T. Mizoguchi, H. Oh-oka & H. Tamiaki, *Photochem. Photobiol*. **81** (2005) P.666.
11) *Chlorophylls* (H. Scheer, ed.), P.731, CRC Press, 1991.
12) *光合成事典*（日本光合成研究会編），P.392，学会出版センター，2003.
13) T. Mizoguchi, T. Y. Kim, S. Sawamura & H. Tamiaki, *J. Phys. Chem. B* **112** (2008) P.16759.

# 5．色素の分析
## d．カロテノイドの分析

高市　真一[1)]

光合成生物にとってカロテノイドの存在は必須であり，多種多様なカロテノイドがある．光合成生物の分類群ごとに特有なカロテノイドもある．本章ではカロテノイドの抽出，精製，同定などの方法を解説する．

## Analysis of Carotenoids in Phototrophic Organisms

Shinichi Takaichi

Presence of carotenoids in phototrophic organisms is essential for light-harvesting and photoprotection, and around 150 kinds of carotenoids are found in these.　Some specific carotenoids are only found in specific groups. In this chapter, the methods for extraction, analysis, purification and identification are explained.

### 5.d.1　はじめに

光合成生物にとってカロテノイドの存在は必須であり，光合成における機能が解明されつつあるが，まだ不明な点も多い．クロロフィルに比べて多種多様なカロテノイドが存在する．即ち，自然界には750種類以上のカロテノイドが知られているが[1)]，光合成に関与するカロテノイドは生合成中間体を含めて150種類くらいと思われる[2)]．主要なカロテノイドとして，陸上植物の葉緑体にはほぼ共通して$\beta$-カロテン，ルテイン，ビオラキサンチン，9'-シス・ネオキサンチンと微量成分として$\alpha$-カロテン，ゼアキサンチン，アンテラキサンチンがある．藻類は多種多彩で，微細藻類を中心に系統性の再検討がなされていて，一部の藻類では分析が充分でない．$\beta$-カロテンとゼアキサンチンがほぼ共通して主成分である．クリプト藻の$\alpha$-カロテンとアロキサンチン，黄緑藻のジアジノキサンチンとジアトキサンチン，珪藻や褐藻やハプト藻のフコキサンチン，渦鞭毛藻のペリジニン，真正眼点藻のビオラキサンチン，ユーグレナ藻のジアジノキサンチンと9'-シス・ネオキサンチンなど分類群に特有なカロテノイドの存在も知られている．以上のカロテノイドは両側の末端基が$\beta$あるいは$\varepsilon$末端基である．原核光合成生物はさらに多様なカロテノイドを持つ．シアノバクテリアは$\beta$-カロテンとその水酸化あるいはケト化した誘導体とミクソール配糖体，紅色細菌はメトキシ化した非環状カロテノイド，緑色硫黄細菌と緑色糸状細菌は$\gamma$-カロテン誘導体，ヘリオバクテリアは炭素数30のカロテンを主成分とする[2)]．代表的なカロテノイドの構造式を図1に示した．

本章ではカロテノイドの抽出，分析，精製，機器分析による同定の方法などの一般的な解説をする．詳しくは〝カロテノイド：その多様性と生理活性〟高市編，裳華房(2006)[2)]を参照して欲しい．また生物材料ごとの事例に関しては〝Methods in Enzymology, vol. 213〟[3)]，〝Carotenoids, vol. 1A〟[4)]などを参照して欲しい．個々のカロテノイドの構造式や性質などは上記〝カロテノイド〟[2)]あるいは〝光合成事典〟[5)]，〝Carotenoids, Handbook〟[1)]，生理活性脂質データベース[6)]のカロテノイド部門などを参照して欲しい．

### 5.d.2　抽出[2-4)]

新鮮な生物材料を使うことが望ましいが，材料を保存する場合はできるだけ低温に保存した方がよい．また抽出後は異性化や分解を受け易くなるので，生物材料のまま保存する方がよい．カロテノイドは光あるいは温度による異性化，酸素による酸化，重合，分解などを受けやすく，また酸あるいはアルカリにより化学構造の変化が起こることもある．できるだけ弱光の所で実験をおこなう，試料は低温で保存する，また窒素置換後，密栓をして酸素にふれないようにする，などの注意が必要である．さらに有機溶媒は人の健康に害を及ぼすのでドラフトなどの換気施設の中で操作しなければならない．特にクロロホルムなどハロゲン化物は他の有機溶媒よりも人体に対する毒性が高いので，できれば他の有機溶媒に置き換えた方がよい．

1）日本医科大学生物学教室（日本医大・生物）

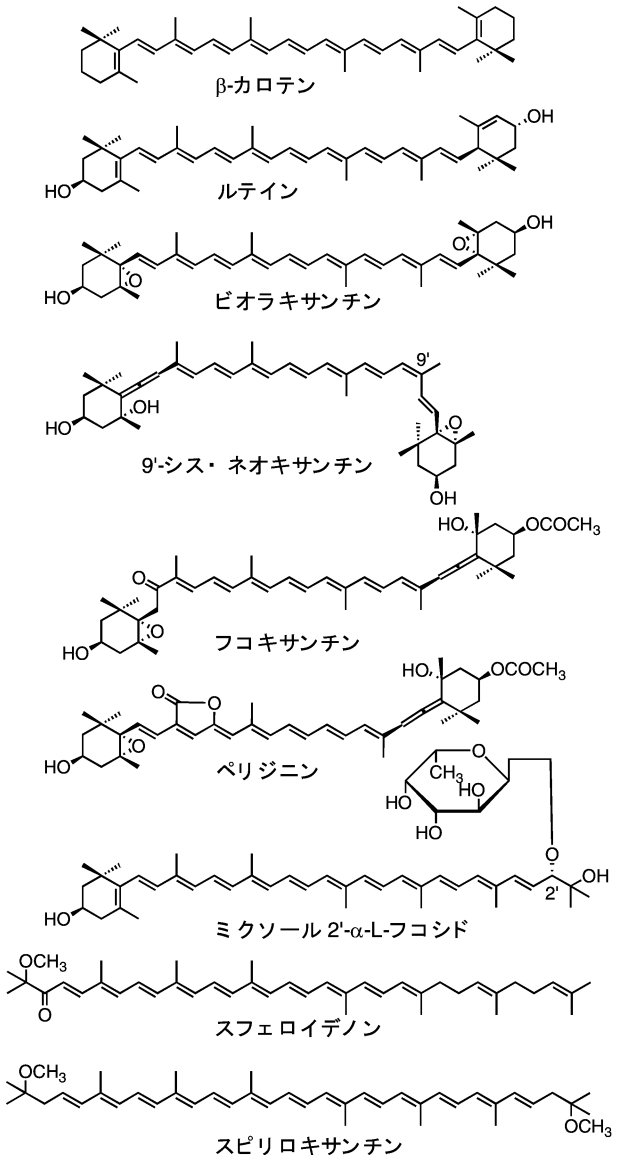


図1：代表的なカロテノイドの構造式.

生物材料ごとに抽出方法は千差万別である．生物材料は水分を含んでいるので，前もって水分を減少させ，抽出には水と混ざる有機溶媒を用いる．一般にはメタノール，アセトン，アセトン／メタノール(7：2)，クロロホルム／メタノール（1：2）などがよく用いられ，色がなくなるまで抽出を数回繰り返す．凍結乾燥した生物材料の場合は，材料の保存性がよく抽出しやすいこともあるが，時に有機溶媒により細胞壁成分が固化して有機溶媒が浸透しにくくなることもあり，このときは湿った状態に戻すと抽出しやすくなることがある．有機溶媒中で超音波あるいは乳鉢などによる破砕をすると抽出の効率が上がる．抽出溶媒の体積を増やし，抽出回数を多くすると抽出の効率は上がるが，その反面，抽出液の体積が多くなりその後の処理がしにくくなる．生物材料によっては有機酸などの酸性物質，あるいは塩基性物質を多量に含み，また抽出用クロロホルムは塩酸を含むことがあるので，濃い緩衝液を少量入れて pH 変化を防ぐと良い．

抽出液に多量の水分が含まれる場合は，抽出液にヘキサン，次いで水を加えて，ヘキサン層と含水有機溶媒層に分離させると，カロテンおよび低極性キサントフィルはヘキサン層に含まれ，体積の減少，水分と夾雑物の除去をすることができる．酢酸エチル層と水層に分配する方法もある．水分が少ないときは直接ロータリーエバポレーターで有機溶媒を除去する．エタノールを加えて，水とエタノールの共沸を利用すると水分を除去しやすい．

有機溶媒での抽出により，カロテノイドばかりでなく，中性脂質，リン脂質，糖脂質，キノン，膜タンパク質，クロロフィルなど脂溶性物質も抽出されてくる．ただし光合成生物では脂質類に対してカロテノイド含量が多いので，多くの場合，そのまま分析できる．脂質類の妨害が問題となるときは，ケン化（アルカリ分解）により除くことができる．抽出物をエタノールあるいはジエチルエーテルに溶かし，60％(w/v)水酸化カリウム水溶液を1/10 容入れ，気相を窒素置換し，暗所，室温で 4-6 時間あるいは 60℃で 20 分放置する．その後，等量のジエチルエーテルあるいはヘキサン，次いで塩化ナトリウム溶液を入れると二層に分離する．カロテノイドは有機溶媒層に残るが，脂質はグリセリンと脂肪酸塩に，クロロフィルはクロロフィリドとフィトールに加水分解して水層に移動する．ただし花弁やある種の藻類などにはカロテノイド脂肪酸エステル，ある種の光合成細菌にはカロテノイド配糖体脂肪酸エステルがあり，これらのカロテノイド誘導体はケン化により脂肪酸を失うので注意が必要である．またフコキサンチンやペリジニンなどのアセチル基も外れてしまう．

## 5.d.3　分析方法[2)]

陸上植物の葉緑体，既にカロテノイドが同定されている生物，近縁種のカロテノイドが同定されている生物，などは，フォトダイオードアレイ検出器（PDA）を接続し，逆送系カラムを装着した高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を使用すると，溶出時間と吸収スペクトルからカロテノイドをほぼ同定できることがある．ただし分光光度計に較べて PDA は，波長分解能が低くまた 1-2 nm の波長のズレはおこる可能性はある．

逆送系カラムはシリカゲルにオクタデシルシラン基

(ODS，$C_{18}$)を結合させたものであり，多用されている．最近は $C_{30}$，$C_8$，$C_2$ などの製品もあり，$C_{30}$ はシス体の分離に便利である．各メーカーから多種類の製品が出ていて，製品毎に $C_{18}$ の結合割合，残存水酸基の処理方法，残存シリカの割合などが異なるため，性質に差異がある．少量の中極性から高極性溶媒に溶かしたカロテノイドは，カロテノイドの炭化水素部分と吸着剤の炭化水素部分との疎水結合により吸着し，初めに高極性成分が，最後にカロテンが溶出してくる．共役や非共役二重結合の数が多いほど早く溶出する．カラムの種類あるいは溶出溶媒を変えると，溶出時間が大きく変わることがある．先ずは文献と同じカラムと同じ溶出条件を用い，必要に応じて条件を変更するとよい．溶出時間は，カラムの汚れ具合や温度などにも大きく影響を受け，多少の変動がみられることがある．粗抽出液では脂質などの影響で精製物と溶出時間が異なることがある．そのため文献値との比較ではなく，既知のカロテノイドと比較対照した方がよい．

緑葉，シアノバクテリア，紅色細菌の HPLC 分析例を最後に示した．

## 5.d.4　吸収スペクトル[2,7)]

カロテノイドの吸収スペクトルの形および吸収極大波長は，共役二重結合の数，β 末端基の数，溶媒に依存する．従って吸収スペクトルよりこれらの数を推定できる．共役二重結合の数が多いほど吸収極大波長は長波長になり，共役二重結合系が同じカロテノイドでは水酸基やエポキシ基などの有無，例えば β-カロテンとゼアキサンチン，は吸収スペクトルに影響を与えない．表 1 にメタノール（HPLC 溶媒，PDA 測定）中の代表的なカロテノイドの吸収極大波長をまとめた．また環状構造をもたない鎖状カロテノイド，共役二重結合の数が 3 のフィトエンから 13 のスピリロキサンチン，の吸収スペクトルを図 2 に示した．鎖状カロテノイドは 3 つの吸収極大波長が明瞭であるが，β 末端基の数が 1，2 個と増えると極大ピークがブロードになる（図 3）．一般に溶媒の分極率が低い *n*-ヘキサンより高い二硫化炭素の方が吸収スペクトルが長波長シフトするので（図 4），カロテノイドの吸収スペクトルを示すときは，必ず溶媒の種類を明記しなければいけない．また共役したカルボニル基（ケト基，アルデヒド基）を持つカロテノイドは，吸収スペクトルが一つの幅広い形であるが，カルボニル基を $NaBH_4$ で還元すると吸収スペクトルはピークをもつ形に変化する．また色

**表 1**：種々のカロテノイドのメタノール中での吸収極大波長[2)]．

| $N$ | $N_p$ | $N_r$ | 吸収極大波長（nm） | | | | %III/II | $\%D_B/D_{II}$ | カロテノイド |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 3 | 3 | 0 | | (276) | 284 | (294) | | | フィトエン |
| 5 | 5 | 0 | 254 | 329 | 346 | 365 | 85.0 | 10.1 | フィトフルエン |
| 7 | 7 | 0 | 295 | 377 | 398 | 422 | 95.0 | 5.2 | ζ-カロテン |
| | | | 295 | 374 | 395 | 419 | 89.9 | 11.1 | 非対称 ζ-カロテン |
| 8 | 8 | 0 | 309 | 397 | 419 | 446 | 97.7 | 5.8 | シフォナキサンチン還元型 |
| 9 | 9 | 0 | 328 | 413 | 436 | 465 | 90.2 | 6.8 | ニューロスポレン |
| | | | 326 | 415 | 436 | 466 | 89.9 | 5.0 | ビオラキサンチン |
| 10 | 10 | 0 | 344 | 427 | 452 | 482 | 78.5 | 10.6 | スフェロイデン |
| 11 | 11 | 0 | 360 | 442 | 468 | 499 | 68.7 | 9.2 | リコペン |
| 12 | 12 | 0 | 372 | 454 | 480 | 513 | 65.2 | 10.7 | アンヒドロロドビブリン |
| 13 | 13 | 0 | 385 | 464 | 492 | 524 | 63.8 | 14.1 | スピリロキサンチン |
| 9 | 8 | 1 | 324 | (405) | 426 | 451 | 52.4 | 6.0 | β-ゼアカロテン |
| 10 | 9 | 1 | 335 | (422) | 442 | 471 | 61.2 | 5.6 | α-カロテン |
| | | | 335 | (422) | 443 | 470 | 61.7 | 5.3 | ルテイン |
| 11 | 10 | 1 | 346 | (436) | 457 | 485 | 30.4 | 13.5 | γ-カロテン |
| | | | 350 | (437) | 459 | 488 | 45.5 | 7.4 | クロロバクテン |
| 12 | 11 | 1 | 361 | (446) | 468 | 499 | 46.2 | 17.4 | バクテリオルビキサンチン |
| 13 | 12 | 1 | 379 | (463) | 484 | 516 | 40.7 | 13.0 | トルレン |
| 11 | 9 | 2 | 341 | (429) | 449 | 475 | 24.6 | 5.4 | β-カロテン |
| | | | 341 | (427) | 448 | 475 | 27.4 | 5.7 | ゼアキサンチン |
| | | | 341 | (425) | 448 | 475 | 30.9 | 9.9 | ノストキサンチン |

$N$，共役二重結合の数；$N_p$，ポリエン鎖中の $N$; $N_r$，共役 β 端末基の数；$N = N_p + N_r$
HPLC に接続したフォトダイオードアレイ検出器（PDA），室温で測定した．PDA の波長分解能（波長間隔 1.3 nm）のため 1-2 nm の差異がでることがある．吸収極大波長は吸収スペクトルの微分から求め，カッコ内は吸収の肩を示す．

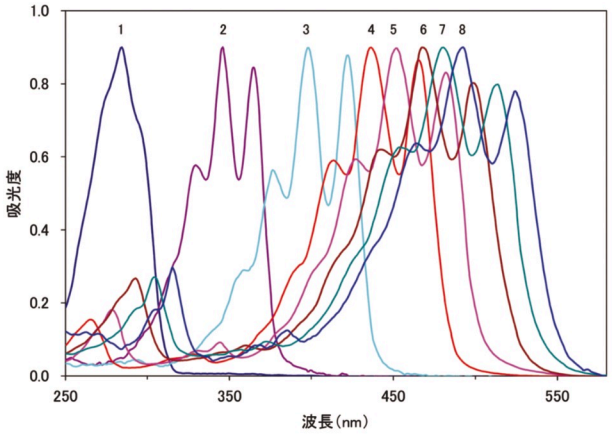



**図2**：非環状カロテノイドのメタノール中での吸収スペクトル．括弧内に共役二重結合の数を示した．1：フィトエン(3)，2：フィトフルエン(5)，3：ζ-カロテン(7)，4：ニューロスポレン(9)，5：スフェロイデン(10)，6：リコペン(11)，7：ロドビブリン（12)，8：スピリロキサンチン（13)．

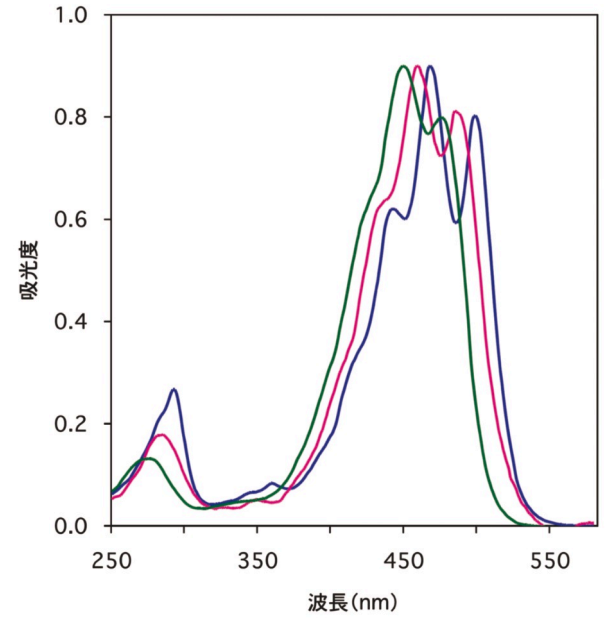



**図3**：吸収スペクトルに対するβ末端基の数の影響．メタノール中のβ-カロテン(緑)，γ-カロテン(赤)，リコペン(青)の吸収スペクトル．

素タンパク複合体に結合すると，カロテノイドの吸収スペクトルは長波長にシフトすることが多い．

同じ共役二重結合系をもつカロテノイドは同一溶媒中ではほぼ同じ分子吸光係数である．一方，同一カロテノイドでも溶媒により吸収極大波長ばかりでなく分子吸光係数も異なることが知られている．これらはDavies & Köst[8]，Britton[9]にまとめられているが，多数の論文のデータをまとめたため，測定精度の違いなどのため一部の値に差異が見られる．その中から代表的なカロテノイドの分子吸光係数を表2にまとめた．一般に粗抽出液の

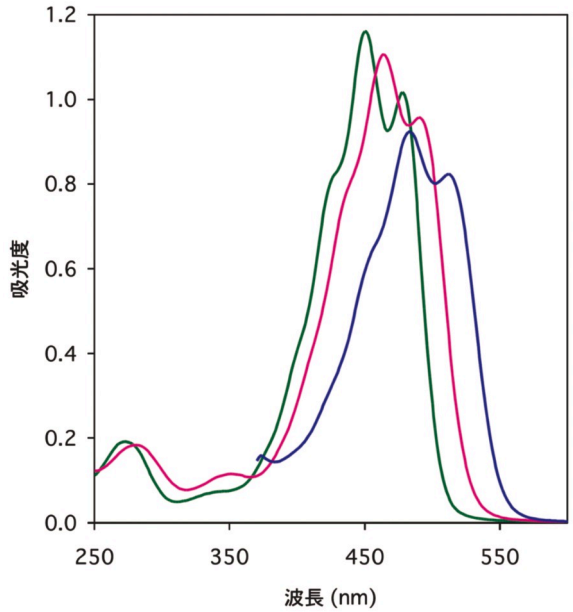



**図4**：種々の有機溶媒中でのβ-カロテンの吸収スペクトル．濃度は同一：*n*-ヘキサン（緑)，クロロホルム（赤)，二硫化炭素（青)．

ようなカロテノイド混合物あるいは未知カロテノイドを定量するときは，吸収極大波長において$E^{1}\%=2500$あるいは$\varepsilon=140\ \mathrm{mM^{-1}\cdot cm^{-1}}$を使用する．試料の吸光度が1であると，約4 μg/mlあるいは約7 μMに相当する．またHPLCを用いて簡便的に各カロテノイドを定量するときは，HPLC各ピークの吸収極大波長における分子吸光係数が同一と仮定し，そこから求めた量を比較することもできる．

## 5.d.5　分離精製[2-4)]

分離精製はいくつかの方法を組み合わせて行う．抽出物を有機溶媒と水へ分配することや，乾固後，有機溶媒で再抽出することにより一部の夾雑物を除去できる．次に各種クロマトグラフィーの組合せで分離精製をする．このとき順相系（シリカゲルなど）と逆相系（$C_{18}$など）の吸着剤の両方を用いた方がよい．HPLCあるいは薄層クロマトグラフィー（TLC）からの分取，カラムクロマトグラフィーによる分離を行う．DEAE-Toyopearl 650Mカラムクロマトグラフィーを使用すると，カロテノイドはヘキサン／アセトン混液で溶出し，カロテノイド配糖体はアセトン濃度を上げると溶出し，(バクテリオ）クロロフィルはアセトン／メタノール混液で溶出する．(バクテリオ)クロロフィルや極性脂質の除去に有効である[10)]．粗抽出液中のカロテノイドは脂質など夾雑物の影響で，精製されたカロテノイドとクロマトグラ

表2：種々のカロテノイドの種々の有機溶媒中での分子吸光係数の例[2]．

| カロテノイド | 溶媒 | λ | ε | 溶媒 | λ | ε | 溶媒 | λ | ε |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| フィトエン | H | 286 | 50 | | | | | | |
| ζ-カロテン | H | 400 | 138 | | | | | | |
| ニューロスポレン | P | 438 | 147 | | | | | | |
| ビオラキサンチン | Et | 441 | 150 | B | 454 | 134 | | | |
| スフェロイデン | | | | B | 465 | 157 | | | |
| リコペン | P | 472 | 185 | B | 487 | 181 | | | |
| アンヒドロロドビブリン | P | 482 | 153 | | | | | | |
| スピリロキサンチン | H | 493 | 152 | B | 510 | 147 | | | |
| γ-カロテン | H | 462 | 148 | | | | | | |
| α-カロテン | H | 446 | 146 | C | 456 | 130 | $CS_2$ | 477 | 117 |
| ルテイン | Et | 445 | 145 | B | 458 | 127 | $CS_2$ | 475 | 123 |
| β-カロテン | H | 451 | 135 | C | 465 | 129 | $CS_2$ | 484 | 108 |
| ゼアキサンチン | Et | 450 | 145 | | | | | | |
| フコキサンチン | H | 449 | 105 | | | | $CS_2$ | 478 | 134 |
| ペリジニン | Et | 472 | 84 | C | 470 | 81 | | | |

λ：吸収極大波長(nm)，ε：分子吸光係数($mM^{-1}cm^{-1}$)，B：ベンゼン，C：クロロホルム，$CS_2$：二硫化炭素，Et：エタノール，H：ヘキサン，P：石油エーテル．

フィーでの挙動が異なることがある．また一般にカロテノイドは精製が進むほど不安定になり，異性化や分解などがおこりやすくなるので注意を要する．

## 5.d.6 同定[2)]

一般的にカロテノイドを同定するには，①既知カロテノイドとのHPLC溶出時間あるいはTLC移動度の一致，②吸収スペクトルの一致，③質量数の決定，の3点が最低限必要である．カロテノイドによってはこれだけで同定できる場合と，不可能な場合がある．ただし近縁生物の持つカロテノイドとの比較，生合成経路なども考慮すると可能性が絞られてくることもある．

新規カロテノイドあるいは既知カロテノイドの化学構造を正確に決定するには次のデータを必要とする．①吸収スペクトルから共役二重結合系の構造を決定する．②クロマトグラフィーでの挙動から極性基を推定する．③質量分析で分子イオンから質量数を決定する．④質量分析のフラグメンテーションパターン，極性基の化学的な検出などから極性基の種類と数を決定する．⑤$^{1}$H-NMR，$^{13}$C-NMRを測定する．⑥必要ならばCDスペクトルから立体構造を決定する．

### 5.d.6.1 質量分析[2,11)]

質量分析では分子イオンから質量数を決定でき，さらにフラグメントイオンの解析により分子構造を推定できる．近年発達したFAB法，FD法などソフトなイオン化法を用いると分子イオンを得やすい．さらにHPLCとオンラインで接続したLC/MSとして用いられるイオン化法もある．主に質量数決定に用いられる．また磁場型装置を用いて高分解能質量を測定すると，カロテノイドの正確な分子式(分子を構成する炭素，水素，酸素の各々の数）を決定できるので，新規化合物の同定には高分解能質量分析は欠かせない．

### 5.d.6.2 核磁気共鳴[2,12)]

核磁気共鳴（NMR）は$^{1}$Hと$^{13}$Cの化学シフトを測定することにより，有機物の化学構造について最も多くの構造情報を与える測定法であり，カロテノイドの化学構造決定には必須の測定である．最近は測定のソフトなどの改良により，$^{1}$H-NMRや$^{13}$C-NMR一次元測定のみならず各種の二次元NMRスペクトルも容易に測定できるようになった．また天然存在比1.1%の$^{13}$Cも濃縮せずに測定できる．通常は重クロロホルムに溶かす．試料が微量な時は残存溶媒や水分に由来するシグナルの影響を受けやすいので，前もって十分に乾燥させる必要がある．脂質は紫外吸収を持たないので，精製したときに夾雑物として残りやすいので脂肪酸のシグナルには注意が必要である．

カロテノイドは中央の共役二重結合が長いので，左右非対称構造のカロテノイドの場合，例えばルテイン（図1参照)，左半分の構造に由来するNMRスペクトルと右半分に由来するNMRスペクトルは，お互いに影響せずに両者を足しあわせたスペクトルになる．Englertは多数の半分の構造のNMRデータをまとめた[12)]．このデータと測定データを比較して同定することができる．

### 5.d.6.3 円偏光二色性[2,13)]

不斉炭素をもち立体異性の存在する有機物は左右の円偏光に対するモル吸収係数が異なり，これを円偏光二色性（CD）という．カロテノイドは不斉炭素を末端原子団

にもつと紫外領域（200–400 nm）の CD は相当な強度を示すので，不斉炭素の立体構造を決めることができる．一方，可視領域（350–550 nm）では一部のカロテノイドを除いて CD は強度が非常に弱い．一般に溶媒としてジエチルエーテル／イソペンタン／エタノール（5：5：2）を用いる．

## 5.d.7　分析例

緑葉，シアノバクテリア，紅色細菌の色素を $C_{18}$-HPLC で分析した例を示す[2]．

緑葉から色素を抽出するときは，液胞にある有機酸などによるカロテノイドのエポキシ基の構造変化を防ぐため，1 M Tris-HCl (pH 8.0) 1/10 容を加えて酸性化を防ぐと良い．乳鉢にアセトンあるいはアセトン／メタノール（7：2）を加えて葉を破砕し，色素を 2–3 回抽出する．葉緑体の場合は有機溶媒を加えただけでも抽出できる．ロータリーエバポレーターを用いて有機溶媒を除く．残った水分はエタノールを加えると蒸発させやすい．ホウレンソウ粗抽出色素の $C_{18}$-HPLC 溶出を図 5 に示した．一般にルテインとゼアキサンチンは構造式が似ているために分離しにくい．キサントフィルサイクルのカロテノイドを研究するのでないときは，1 時間くらい暗所に放置して，ゼアキサンチンとアンセラキサンチンがビオラキサンチンに戻ってから抽出した方がよい．葉緑体の色素は既に知られているので，溶出順と吸収スペクトルから同定できる．

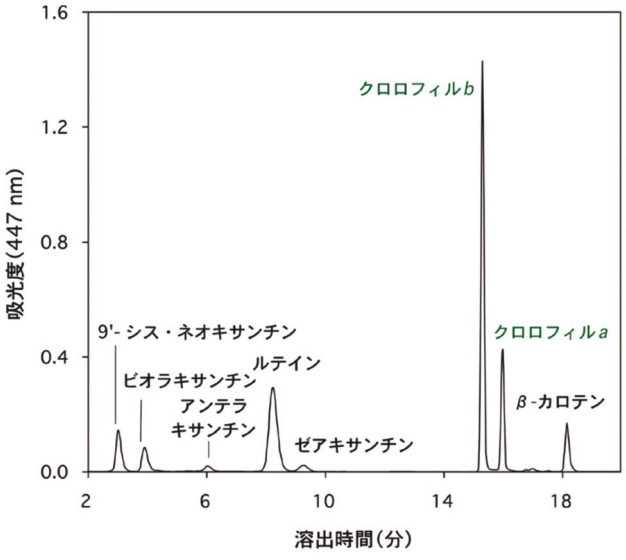



図 5：緑色植物の色素の $C_{18}$-HPLC 分析例．ホウレンソウ葉の粗抽出色素；光照射によりキサントフィルサイクルのアンテラキサンチン，ゼアキサンチンが増加する条件に置き，抽出した．カラム：ノバパック $C_{18}$（RCM タイプ，ウオーターズ），溶出溶媒：0–8 分；1.75% メタノール，1.75% ジクロロメタン，1.75% 水，94.75% アセトニトリル：8–20 分；50% アセトニトリル，50% 酢酸エチル（2.0 ml/分）．

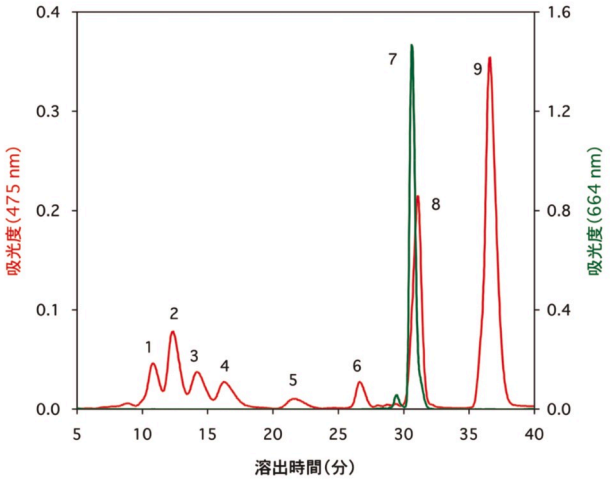



図 6：シアノバクテリアの色素の $C_{18}$-HPLC 分析例．ノストック・コミューニー M-13 の粗抽出色素．カラム：μ ボンダパック $C_{18}$（RCM タイプ，ウオーターズ），溶出溶媒：0–20 分；90% メタノール：20–40 分；100% メタノール（2.0 ml/分）．1：2-ヒドロキシ-ミクソール 2'-フコシド，2：ノストキサンチン，3：ミクソール 2'-フコシド，4：カロキサンチン，5：ゼアキサンチン，6：カンタキサンチン，7：クロロフィル *a*，8：エキネノン，9：β-カロテン．

シアノバクテリア[10] や紅色光合成細菌の沈澱菌体にアセトン／メタノール（7：2）を約 5 倍容加え，超音波破砕し，遠心分離して色素抽出液を得る．沈澱からもう 1–2 回同様に抽出する．ロータリーエバポレーターを用いて有機溶媒及び水分を除く．粗抽出色素の $C_{18}$-HPLC 溶出パターンを図 6，7 に示した．

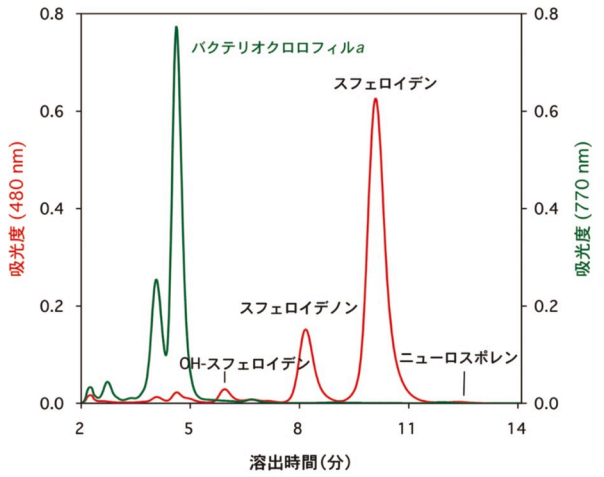



図 7：光合成細菌の色素の $C_{18}$-HPLC 分析例．紅色光合成細菌ロドバクター-スフェロイデスの粗抽出色素．カラム：μ ボンダパック $C_{18}$（RCM タイプ，ウオーターズ），溶出溶媒：メタノール（1.8 ml/分）．

カロテノイドの蛍光，ラマン，カロテノイドシフトなど物理化学的性質は各章を参照して欲しい．カロテノイド生合成経路の解析には二つの方法がある．生合成経路の後の方の遺伝子・酵素，例えばβ-カロテン・ケトラーゼ（CrtO，CrtW），の性質は遺伝子破壊株を作成して蓄積するカロテノイドと合成できないカロテノイドを分析する[14]．生合成経路の始めの方の遺伝子・酵素，例えばβ-カロテン・ヒドロキシラーゼ（CrtR），は大腸菌（カロテノイドを合成できない）に基質を合成する遺伝子を導入し，さらに調べたい遺伝子を導入して，遺伝子発現により生産されたカロテノイドを分析する[15]．

## 参考文献


1）G. Britton, S. Liaaen-Jensen, H. Pfander, (ed.), Carotenoids, Handbook, Birkuhäuser, Basel, 2004.

2）高市真一編，「カロテノイド：その多様性と生理活性」，裳華房，2006．

3）L. Packer, (ed.), Methods in Enzymology, vol. 213: Carotenoids, Part A: Chemistry, Separation, Quantitation, and Antioxidation, Academic Press, San Diego, 1992.

4）G. Britton, S. Liaaen-Jensen, H. Pfander, (ed.), Carotenoids, vol. 1A: Isolation and Analysis, Birkuhäuser, Basel, 1995.

5）日本光合成研究会編，「光合成事典」，学会出版センター，2003．

6）生理活性脂質データベース　http://lipidbank.jp/

7）S. Takaichi, Photosynth. Res. **65** (2000) p.93.

8）B. H. Cavies, H.-P. Köst, CRC Handbook of Chromatography: Plant Pigments, vol. I, Fat-Soluble Pigments, ed. H.-P. Köst, CRC Press, Boca Raton, 1988.

9）G. Britton, Carotenoids, vol. 1B: Spectroscopy, ed. G. Britton, S. Liaaen-Jensen, H. Pfander, Birkuhäuser, Basel, 1995, p.13.

10）S. Takaichi, M. Mochimaru, T. Maoka, Plant Cell Physiol. **47** (2006) p.211.

11）C. R. Enzell, S. Back, Carotenoids, vol. 1B: Spectroscopy, ed. G. Britton, S. Liaaen-Jensen, H. Pfander, Birkuhäuser, Basel, 1995, p.261.

12）G. Englert, Carotenoids, vol. 1B: Spectroscopy, ed. G. Britton, S. Liaaen-Jensen, H. Pfander, Birkuhäuser, Basel, 1995, p.147.

13）R. Buchecker, K. Noack, Carotenoids, vol. 1B: Spectroscopy, ed. G. Britton, S. Liaaen-Jensen, H. Pfander, Birkuhäuser, Basel, 1995, p.63.

14）M. Mochimaru, H. Masukawa, S. Takaichi, FEBS Lett. **579** (2005) p.6111.

15）T. Makino, H. Harada, H. Ikenaga, S. Matsuda, S. Takaichi, K. Shindo, G. Sandmann, N. Misawa, Plant Cell Physiol. **49** (2008) p.1867.


注）Carotenoids, Vol. 1A，1B は絶版であるが，Caro Nature から入手できる．

# 5．色素の分析
## e．フィコビリンの単離と分析

石塚　量見[1)]，池内　昌彦[1)]

フィコビリンはシアノバクテリアや灰色藻，紅藻，クリプト藻などの真核藻類における主要な光合成の集光色素であり，タンパク質と共有結合している．本項では光合成色素としてのフィコビリンの性質，分析・単離法およびフィコビリタンパク質について述べる．

## Phycobilins

Takami Ishizuka, Masahiko Ikeuchi

We summarized technical protocols for preparation, separation and identification of phycobilins extracted from cyanobacterial cells.

### 5.e.1　概論：フィコビリン色素の構造と吸収

フィコビリン phycobilin は藻を表す phyco と胆汁を表す bile の合成語である．フィコビリンはシアノバクテリアや灰色藻，紅藻，クリプト藻などの真核藻類に広く分布する開環テトラピロールで，タンパク質と結合してフィコビリタンパク質を形成し，主要な光合成色素として重要な役割を果たしている．フィコビリタンパク質は通常，フィコビリソーム（3章4e項参照）という超複合体を構成するが，フィコビリソームをもたないクリプト藻や *Prochlorococcus* 類においても光合成の集光色素としてはたらいている．

これまでに知られている光合成の集光色素としては，4種のフィコビリン（フィコシアノビリン，フィコエリスロビリン，フィコビオロビリン，フィコウロビリン）がある（図1）．これらは互いによく似た開環テトラピロールで，すべてプロトヘムを開裂して生成するビルベルジンⅨを出発物質として合成される（図2）．それぞれの吸収スペクトルはテトラピロール分子内の共役二重結合の長さに依存する．A環の二重結合とD環の二重結合がともに還元されたものはフィコシアノビリンで，出発のビリベルジンよりも数十 nm ほど短波長の吸収ピークを示す．フィコシアノビリン以外の色素はピロール環の間の二重結合が還元されることで，共役二重結合が短くなっており，より短波長の光を吸収することができる．これらの色素はクロロフィル *a* の2つのピークの間を補う吸光特性をもつため，光の波長特性が大きく変化する水環境に生息する藻類に広く分布する．なお，フィコビリン以外のビリン色素としては，フィトクロムに結合するフィトクロモビリンやビリベルジンもあるが，ここでは触れない．

フィコビリン色素はすべてアポタンパク質に共有結合しており，これをフィコビリタンパク質という．これらは大きく，フィコシアニン，アロフィコシアニン，フィコエリスリン，フィコエリスロシアニンに分けられるが，互いに相同で，グロビンスーパーファミリーに属する．また，フィコビリソームのコアメンブレンリンカーの色素結合ドメインも同様の構造をとっている．

用語解説：色素タンパク質の部分を表す用語は一部混乱しているので，ここで整理する．一般に，複合タンパク質はアポタンパク質と補欠分子族 prosthetic group から成り，色素タンパク質の場合は，この補欠分子族が色素である．しかし，フィコビリタンパク質のように色素分子がアポタンパク質に共有結合している場合は，ホロタンパク質を色素（広義）と呼び，補欠分子族の部分を発色団（広義）と呼ぶことも多い．発色団は元来は分子内の光吸収にかかわる部分を表す用語で，共役二重結合など色素分子内の特定の領域を指すこともある（狭義）．

### 5.e.2　フィコシアニンの共有結合の検出例

（図1）で示したように，開環テトラピロールはシステイン残基と共有結合している．この結合はタンパク質を変性させるだけでは切断されない．したがって，開環テ

1）東京大学大学院総合文化研究科広域科学専攻生命環境科学系

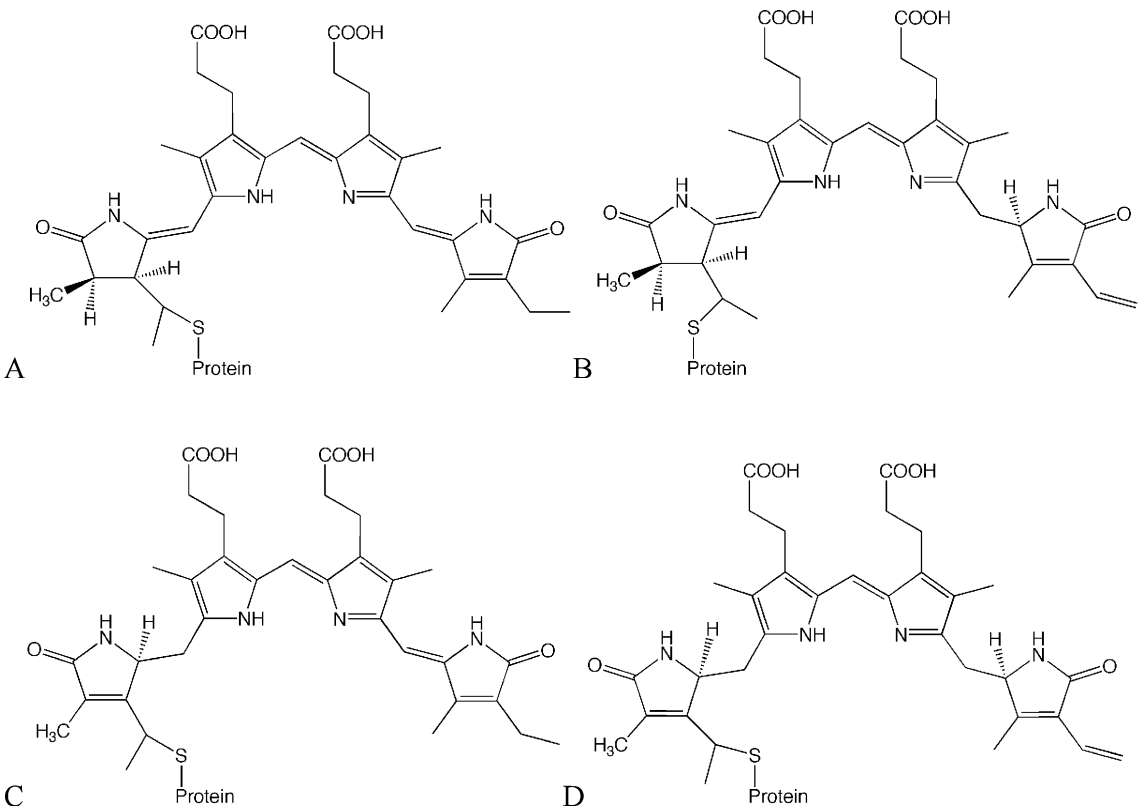



図1：フィコビリン色素．A：フィコシアノビリン，B：フィコエリスロビリン，C：フィコビオロビリン，D：フィコウロビリン．それぞれ，タンパク質の Cys 残基に共有結合している分子構造を示す．なお，フィコエリスロビリンは紅藻のフィロエリスリンではD環でもタンパク質に共有結合している．また，フィコウロビリンも紅藻では，D環でもタンパク質に共有結合している．

トラピロールを結合したタンパク質は SDS-PAGE で着色したバンドとして検出が可能である．フィコシアニンを SDS-PAGE したゲルの例を示す（図 2）．フィコシアノビリンを結合する，フィコシアニン $\alpha$（CpcA），フィコシアニン $\beta$（CpcB），アロフィコシアニン $\alpha$（ApcA），アロフィコシアニン $\beta$（ApcB）のバンドがそれぞれ青いバンドとして認識される．

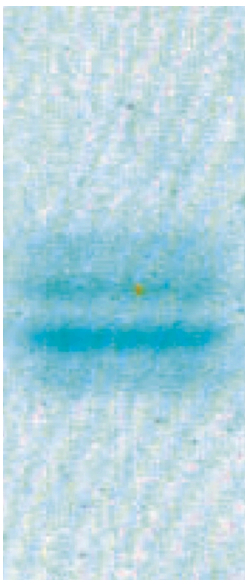


図2：SDS-PAGE で分離したフィコビリタンパク質の青いバンド．上から順に，フィコシアニン $\beta$，アロフィコシアニン $\alpha$，フィコシアニン $\alpha$，アロフィコシアニン $\beta$ のバンドに対応する．

### ［実験方法］SDS-PAGE 後の蛍光検出

フィコビリン色素は開環テトラピロールで共役二重結合系は溶液中ではそれほど安定ではなくモル吸光係数はホロタンパク質と比べて数分の 1 以下となる．したがって，SDS-PAGE 後の変性タンパク質の検出にはしばしば $Zn^{2+}$ 誘導性の蛍光を利用する[1,2]．$Zn^{2+}$ は安定な金属イオンとして開環テトラピロールの各ピロール環の窒素原子に配位することで，ピロール環をつなぐ共役二重結合系の平面性をよくするため，モル吸光係数や蛍光収率を大きく改善する．

1．ポスト染色法：簡便な方法である．SDS-PAGE 泳動後，ゲルを 1 mM 酢酸亜鉛溶液に 30 分間浸して振盪する．もし，白沈を生じる場合は酢酸などの酸性溶液で洗浄して，白沈を除く必要がある．また，後述する FMBIO などの高精度検出器を使用するときは，酢

酸蒸気でミラーが劣化するので，さらに水洗して酢酸を除く必要がある．最近の論文では，ブロッティングしたメンブレンで酢酸亜鉛処理をしていることも多い．

2．ゲル中に添加する方法：濃縮ゲル，分離ゲル，泳動溶液各々に 1 mM 酢酸亜鉛を加えて SDS-PAGE を行う．この場合は，通常は沈澱は生じないので，そのまま蛍光検出できる．この場合は PVDF 膜などにブロットする必要もない．この方法は結果の再現性も高くおすすめである．

3．蛍光検出法：2 次元ゲル蛍光検出装置を使用する．筆者らが使用している FMBIO II（日立製，現在は FMBIO II は生産終了で FMBIO III が販売されている）は，検出感度が非常に高い．励起光は 532 nm レーザー光，検出は 605 nm を使用する．なお，フィコシアノビリンの SDS 溶液中の励起波長は 577 nm，蛍光波長は 623 nm であるが，固定された FMBIO のレーザーと検出の波長設定で十分検出できる．なお，DNA 検出用 UV イルミネーターでも検出は可能であるが，感度は高くない．

## 5.e.3　フィコシアニンの発色団の同定（酸性変性）

開環テトラピロールは各々の共役二重結合系の違いにより異なった吸収ピークを持つ．例えば，フィコシアノビリンは赤色域，フィコエリスロビリン，フィコビオロビリンは緑色域，フィコウロビリンは青色域に吸収ピークを持つ．また，開環テトラピロールはプロトン化すると各開環テトラピロール間で吸収ピークの違いが明確になることが知られている．このため，開環テトラピロールは酸性溶媒に溶かして吸収スペクトルを測定し，その吸収ピークと形から種類を判断することが多い．図 3 はフィコシアノビリンを結合したタンパク質を酸性尿素で変性させた吸収スペクトルである．吸収ピークは 661 nm で，このスペクトルのピーク位置と形はA環とシステイン残基が結合したフィコシアノビリンを反映している．しかし，酸性変性は開環テトラピロールのおおまかな構造しか反映しないので，詳細な構造を知るには結晶解析や，質量分析，NMR などを用いる必要がある．

## 5.e.4　メタノリシス：フィコシアノビリンの単離

開環テトラピロールはアポタンパク質のシステイン残基にチオエーテル結合によって強固に結合している．したがって，発色団を単離してその構造を決定することは重要であるが，容易ではない．これまでにいくつかの抽出例が報告されているが[3]，ここでは Cornejo らの方法[4]を参考にした *Synechocystis* のフィコシアニンからフィコシアノビリンを単離する例を記述する．この方法は，メタノールを用いてフィコビリンとシステイン残基の間の共有結合を解離させるものでメタノリシスと呼ばれる．

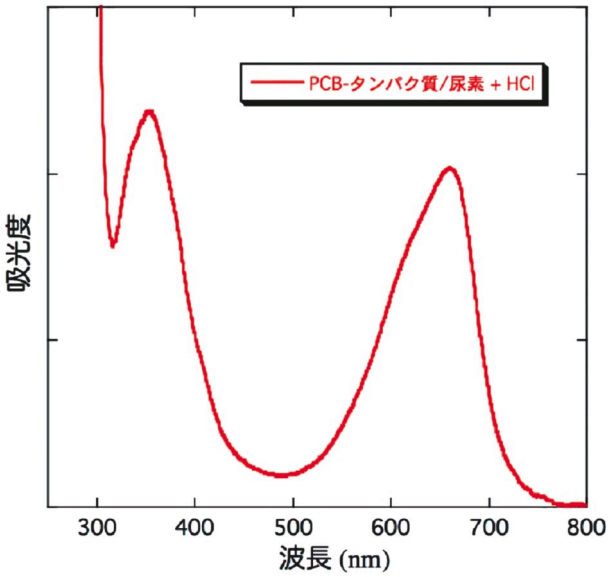



図 3：タンパク質に結合したフィコシアノビリンの酸性変性後の吸収スペクトル．

### ［実験方法］メタノリシス

1．*Synechocystis* の細胞を 100 mM NaCl，20mM Hepes-NaOH，pH7.5 に懸濁し，破砕する．

2．細胞破砕液（約 50 mL）を 100000 x g，30 min 超遠心する．フィコシアニンは上清に回収される．

3．上清に終濃度 1 %TCA（トリクロル酢酸）を加え，1 h，4 °C，暗所で，スターラーバーで穏やかに撹拌する．

4．30000 x g, 20 min 遠心してフィコシアニンを回収する．

5．メタノール洗浄：沈殿にメタノールを加え，超音波処理し，30000 x g，20 min 遠心し，不純物を含む上清を除く．この洗浄を 2 回行う．

6．沈殿を約 1/10 容のメタノールに懸濁し，$HgCl_2$（1 mg $mL^{-1}$）を加え，20 h，42°C，暗所で保温する．$HgCl_2$ は開環テトラピロールがシステイン残基から外す反応を促進する．

7．保温した標品を 10000 x g，10 min 遠心して上清を




図 4：メタノリシスで抽出したビリン色素の薄層クロマトグラフィーによる分離例．矢印はフィコシアノビリンを示す．

回収する．タンパク質から遊離したフィコシアノビリンが上清に抽出される．青い色で抽出を確認できる．

8．上清にメルカプトエタノール（1 μL/mL）を加えて，30000 x g，10 min 遠心し上清を回収する．この操作で $Hg^{2+}$ を還元し沈殿物として除くことができる．遠心チューブの底に白色の沈殿を確認できる．なお，メタノリシスで，$HgCl_2$ を使用しない場合この操作は必要ない．筆者らの経験では，$HgCl_2$ を入れなくてもメタノリシスは十分行われる．この上清をフィコシアノビリン粗標品とする．

### ［実験方法］薄層クロマトグラフィーによる精製

1．シリカゲル薄層（シリカゲル 60，TLC プレート 5553，メルク）を用意する．前処理は不要である．

2．展開溶媒：飽和酢酸エチル．（酢酸エチル：dd$H_2O$＝10：1 の混合液から酢酸エチル層を使用する）

3．フィコシアノビリン粗標品を微量スポットして，密封容器で先端まで展開する．

図 4 の矢印で示したバンドがフィコシアニンから単離した遊離のフィコシアノビリンである．この部分の薄層を掻き取りメタノールで抽出する．フィコシアノビリンは中性メタノール溶媒中で 600 nm 付近に吸収ピークを持ち，これに塩酸を添加すると，一部のピロール環の窒素原子をプロトン化して吸収ピークは 685 nm 付近にシフトする（図 5）．同じ酸性条件である図 3 のピークより約 20 nm 長波長シフトしているが，これはフィコシアノビリンがシステイン残基から遊離していることを示す．この長波長シフトはシステイン残基から遊離した部分が二重結合を再生し，共役二重結合系が長くなったことによる．ちなみに，フィコシアノビリンを結合したタンパク質を中性メタノール溶媒で変性させ吸収スペクトルを測定すると，その吸収ピークは 580〜590 nm になる．薄層クロマトグラフィーの結果（図 4）は，本来のフィコシアノビリンだけでなく数種類の副産物を生じていることも示している．一般的にメタノリシスは多くの開環テトラピロール副産物を生み出すことが知られている．色調が異なるものは異なる物質と判断できるが，例えば，開環テトラピロールのプロピオニル基がモノメチル化，ジメチル化されてしまっても，吸収スペクトルは変化しないことが知られている．したがって，精製品の評価には細心の注意が必要である．なお，開環テトラピロールは二重結合が多く酸化されやすく不安定なので操作は迅速に行う必要がある．

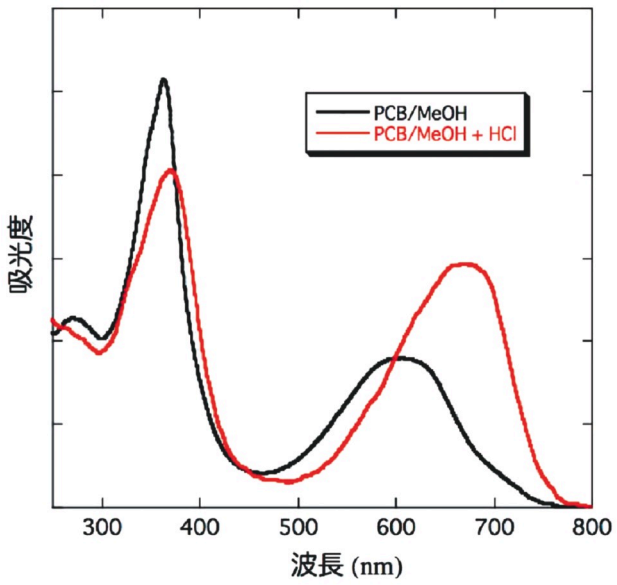



図 5：フィコシアノビリンの吸収スペクトル

## 参考文献

1）A. Auche, C. R. Soc. Biol. 64 (1908) P.297.
2）T. R. Berkelman, & J. C. Lagarias, Anal. Biochem. 156 (1986) P.194.
3）D. J. Chapman, W. J. Cole, & H. W. Siegelman, Biochim. Biophys. Acta. 153 (1968) P.692.
4）J. Cornejo, S. I. Beale, M. J. Terry, & J. C. Lagarias, J. Biol. Chem. 267 (1992) P.14790.
5）H. Falk, The chemistry of linear oligopyrroles and bile pigments, ed. Springer-Verlag 1989.

# 6．タンパク質
## a. SDS-PAGE

井上（菓子野）名津子[1)]，菓子野康浩[2)]

調製した生体試料のタンパク質組成を解析する際などに，最初に行われる最も基礎的な実験のひとつがSDS-PAGEであろう．近年のプロテオミクス解析に於いて広く用いられる等電点二次元電気泳動でも，二次元目にはSDS-PAGEが行われるのが一般的である．比較的容易に行うことができるSDS-PAGEであるが，手元の生体試料に含まれているタンパク質群の中にある重要なタンパク質を見落とさないために留意しておくと良いことがある．本稿では，4種類のSDS-PAGE系を比較しながら，それぞれの実験方法を簡単に記述する．

## SDS-PAGE

Natsuko Inoue-Kashino, Yasuhiro Kashino

SDS-PAGE is one of the very basic techniques for the protein analysis.　One has to keep in mind the availability and the limit of this technique.　In this section, we will describe the characteristics of four SDS-PAGE systems and present the outline of the procedure.

### 6.a.1　各種のSDS-PAGE系

SDS-PAGEは，精製した標品などのタンパク質組成を解析するために頻繁に用いられる基本的な分析法の一つである．SDS-PAGEでタンパク質を分離し，その後ウェスタンブロットによるタンパク質の同定，また，N末端配列解析やMS分析を行うことも日常的に行われる．しかし，SDS-PAGEとひとくちに言っても，いろいろな系が開発されてきており，それぞれに特徴がある．それぞれの特徴をつかんで，自分の研究対象のタンパク質を分離できる系を選ぶことが重要である．また，解析対象の標品に含まれているタンパク質を捉えるためには，ひとつの系にこだわらず，別の系で，あるいはゲル条件を変えて泳動してみることも必要であろう．そのために見たくないものも見えてきてしまうこともあるかもしれないが，誤った結論に行き着かないためには，いま使っている系ではもしかしたら見えていないだけのタンパク質が含まれている可能性もあることも心しておくべきである．またごく少数の例外と言えるかも知れないが，電気泳動後の染色で染色されづらいために，実際には存在するのに検出が困難なNinjaタンパク質[3)]ともいえるタンパク質がある．たとえば，リジン，ヒスチジン，システインを全く含まないPsbWはCoomassieによる染色性がかなり低い[1)]．PsbJも染色性が低く，検出することが困難な場合が多い[2)]．また，*Synechocystis* sp. PCC 6803のPsb30も染色性が低く，また，抗体を使っても検出が困難な場合もある[3)]．pIが泳動バッファのpHよりも大きいと，泳動されないことにもなる．

本稿では，我々の研究室で日常的に用いている4つの系の手順を紹介する．第一は，Mes/Trisの系である[10)]．我々は，日常的には18–24%アクリルアミド，6 M尿素のスラブゲルを作成し，用いている．この条件で，3 kDa程度から100 kDa超まで，膜タンパク質の多くを明瞭に分離することが可能である．場合により，均一アクリルアミド濃度のゲルや，ミニゲルも作成し，用いている[5,6)]．この系は，次に述べる3 M Trisの系の不自由な点を解消するために，3 M Trisの系を元に開発したものである．3 M Trisの系に比べると尿素濃度が低いためか低分子量域で若干シャープさに欠けるバンドもあるが，20〜50 kDa域ではより明瞭なバンドが得られることが多い．また，*Synechocystis* sp. PCC 6803のD1/D2タンパク質は明瞭に別個のバンドとして分離されるが[4)5)]，6 M尿素のゲルでは*Thermosynechococcus elongatus*のD1/D2タンパク質は分離されず単一のバンドとなる．このMes/Trisの系では，通常6 M尿素のゲルで充分な分離が得られるため，冬季室温がかなり下がってしまう研究室でも問題なく使用することができる．また，分離ゲル緩衝液はTris，Mes，SDSを溶解させるだけでpH調整の必要がないため，緩衝液調製が容易であり，また，

1）岡山大学大学院自然科学研究科
2）兵庫県立大学大学院生命理学研究科

緩衝液調製ごとの再現性も充分である．冬季に室温がかなり下がってしまう研究室に於いても，ストック溶液が析出することはない．

第二の系は，池内により開発された3 M Trisの系である[7]．通常使われる16–24%アクリルアミド，7.5 M尿素のゲルにより，3 kDa程度から100 kDa超まで，膜タンパク質の多くを非常に明瞭に分離することが可能である．このゲル条件では，*Thermosynechococcus elongatus* のD1/D2タンパク質も明瞭な別個のバンドとして分離される．ゲルに含まれる尿素濃度が高いため，冬季に温度が低い研究室に於いては，泳動中に尿素が析出することもあり，また，そのような環境では，分離ゲル緩衝液やアクリルアミドのストック溶液も析出することもあるので，注意が必要である．

第三の系は，Schäggerらにより開発されたTris/Tricineの系である[8]．1 kDaから100 kDa程度までを分離できる系である．低分子量域の分離にとくに優れている．ただし，膜画分や膜タンパク質複合体の解析の際は，やはり脂質除去処理（6.a.3.1）を行わないと充分な分離が得られないのは，上記の系と同様である．一方，40 kDa程度以上になるとバンドの間隔が非常に狭くなり，高分子量域の解析には困難が伴うことが多いようである．この系での電気泳動は，上記ふたつの系やLaemmliの系に比べてコスト高になり，また同じゲルサイズでも長い泳動時間が必要であるが，アクリルアミドの濃度勾配を作成する必要がなく，また，ゲルに尿素を含まないので，ゲル作成が容易である．ただし，6 M尿素を含むゲルも用いられることもある[9]．

第四の系は，Laemmliにより報告された系で，最も一般的に使われている．ゲルに尿素が含まれていれば膜タンパク質の分離も申し分ない．また，アクリルアミドの濃度勾配ゲルを作成することにより，分離可能な分子量域も広げることができる．必要な泳動時間も上記3種類の系に比べて短い．ただし，アクリルアミド濃度を上げても，低分子量のタンパク質を明瞭なバンドとして分離することは困難である．10 kDa程度以上のタンパク質を対象とする場合には，この系が便利であろう．

上記のように，それぞれ特徴があるが，系によりタンパク質の移動度が異なり，また，移動度の逆転が起こる場合もある．これを利用して，一次元目と二次元目のゲルの系を変えて二次元電気泳動を行い，分子量が似ているために分離しにくいタンパク質相互を分離することも可能な場合がある．

このように，SDS-PAGEにもいろいろな系があるが，系は違っても，基本的な原理は共通である．タンパク質は多価電解質であり，電場中に置かれると電荷に依存した速度で陽または陰極に移動するので電荷の異なるタンパク質を分離することができる．この際，支持体としてアクリルアミド重合体のゲルを用いるのがPAGE（polyacrylamide gel electrophoresis）である．ポリアクリルアミドゲルは電気泳動の際の良い支持体であり，大きさにより分子を分離する分子篩効果を持つ．界面活性剤SDS（Sodium Dodecyl（またはLauryl）Sulfate）が結合してタンパク質を変性させると，SDSの硫酸基によってタンパク質は負に荷電する．この時結合するSDS量はタンパク質の種類に依らず単位重量当りほぼ一定である．このため，SDSが結合したタンパク質は電場中で陽極に移動し，ポリアクリルアミドゲル中では分子篩効果のために大きな分子ほど移動度が小さく，小さい分子ほど移動度が大きくなる．これにより，ポリペプチドの鎖長（分子量）で移動度が決まる．SDS-PAGEでは，このようにしてタンパク質が分離され，ポリペプチドの移動距離（移動度）から分子量を推定することが可能である．分子量標準試料の移動距離を横軸に，分子量の対数を縦軸にしてプロットして分子量標準曲線を作成する[10]．目的のタンパク質バンドの移動距離を測り，分子量標準曲線から「見かけの」分子量を得ることができる．この「見かけの」分子量は，厳密な意味での分子量ではない．個々のタンパク質の性質も反映され，移動距離は標準曲線から若干ずれることもある．いっぱんに，同じ分子量のタンパク質であっても，膜タンパク質の移動距離は水溶性タンパク質の移動距離よりも大きくなる．

本稿の読者は光合成に関わるタンパク質を研究対象にしていて，そして多くの場合，チラコイド膜など，膜画分のタンパク質の分離が往々にして重要になると考えられる．膜タンパク質をSDS-PAGEで分離する場合，尿素を含むゲルを使用した方がいっぱんにバンドが明瞭である．水溶性タンパク質の場合，尿素が含まれていなくても明瞭なバンドとなることが期待できるが，膜タンパク質の場合は，4〜7 M程度の尿素が含まれている方が分離およびバンドの明瞭度がよい．もちろん，水溶性タンパク質もより明瞭なバンドとして得られる．ただし，本稿で取り上げるTris/Tricineの系では尿素を含まなくても，膜タンパク質が明瞭なバンドとして得られる．尿素がタンパク質の分離に与える影響は，文献[5]で取り上げてある．また，アクリルアミド密度勾配のゲルの方が，均一アクリルアミドゲルよりも，しばしばバンドが明瞭になる（図1）．

これらのことは，レディメィドゲルではなく，実験ごとにゲルを自分で作らないといけないことを意味する．

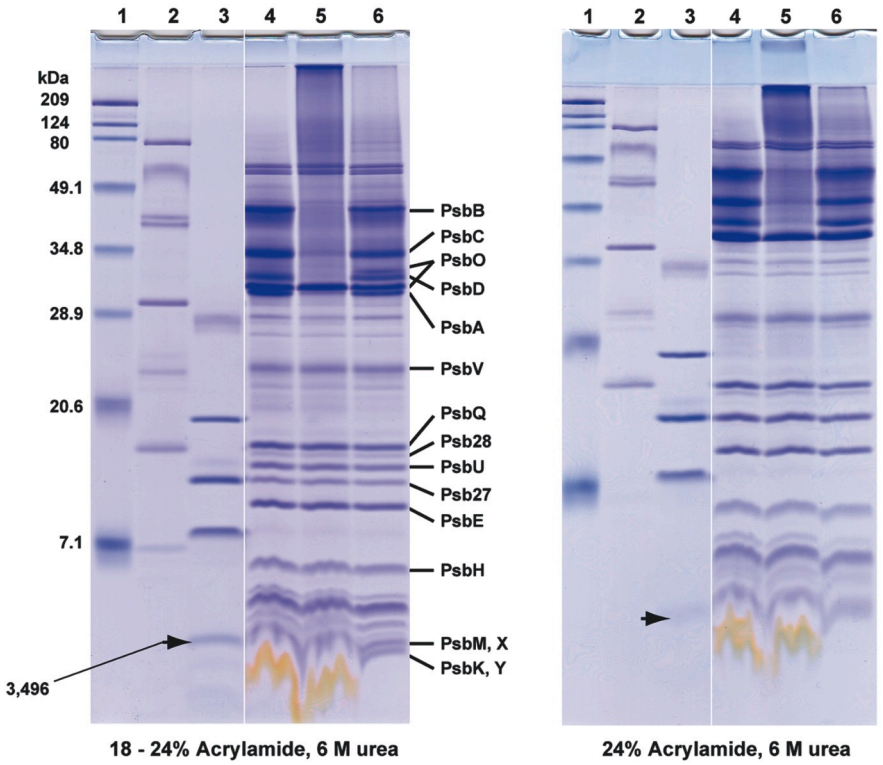



図1：サンプル処理の効果．
*Synechocystis* sp. PCC 6803 HT3 株から精製した光化学系II複合体を使い，変性液を加えただけの場合（Lane 4），変性液を加えた後 95°Cで 5 分間の熱処理を行った場合（Lane 5），脂質除去処理を行った場合（Lane 6）を比較した．いずれも 5 $\mu$g Chl 相当量の光化学系II複合体を泳動した．ゲルは，Mes/Tris 系の 18−24%アクリルアミド濃度勾配ゲルで 6 M 尿素を含む．
Lane 1〜3 は，分子量マーカである．
Lane 1, Bio-Rad 161-0317; Lane 2, Bio-Rad 161-0304; Lane 3, Bio-Rad 161-0326
Lane 3 の 161-0326 には，以下のタンパク質が含まれている．

26,625 Triosephosphate isomerase
16,950 Myoglobin
14,437 $\alpha$-Lactalbumin
6,512 Aprotinin
3,496 Insulin b chain, oxidized
1,423 Bacitracin

尿素を含むゲルは日持ちしないので（尿素の変性と析出のため），せいぜい 2，3 日程度の保存であろう．もし保存する場合は，ゲル板上部をラップで丁寧に包み，水分が蒸発しないようにしておく．尿素濃度が 7.5 M のゲルでは，低温では尿素が析出するので，冷蔵庫での保存は禁物である．

【実験方法】

## 6.a.2　アクリルアミド濃度勾配ゲルの作成

図 2 に示すようにガラス板，ペリスタポンプ，ミキシング管をセットする．ミキシング管の下にスターラを置き，ミキシング管のペリスタポンプに近い側に回転子を入れる．我々は，10 mm 長の三角柱状回転子を使っている．回転子の体積を考慮すると，ミキシング管のペリスタポンプとは離れた側（図 2 では右側）の底面にコインを 1 枚敷くと，二つの管に液を入れたときに液面がほぼ同じ高さになる．ペリスタポンプのプレッシャーノブを回し，適度な強度で送液チューブを締め付ける．ミキシ

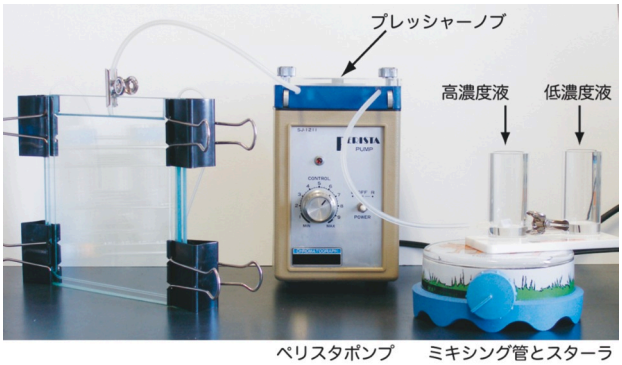



図 2：アクリルアミド濃度勾配ゲルの作製．

ング管の二つの間を繋ぐチューブを目玉クリップで閉じる．目玉クリップの方が，スクリューコックよりも使い勝手が良いようである．

1．まず低濃度アクリルアミド溶液に過硫酸アンモニウム液を加えて攪拌し，次いで TEMED を加えて攪拌する．この溶液を，ミキシング管のペリスタポンプとは離れた側（図 2 では右側）に入れる．
2．ミキシング管の二つの管を繋ぐチューブを閉じた目玉クリップを少し開き，このチューブ内の空気を押し出し，また目玉クリップを閉じる．
3．高濃度アクリルアミド溶液に，1 と同様にして過硫酸アンモニウム液と TEMED を加え，ミキシング管のペリスタポンプに近い側（図 2 では左側）に入れる．このとき，プレッシャーノブを閉め忘れていると液が送液チューブに流れ込んでしまう．その場合は，慌てずにプレッシャーノブを締め，ミキシング管の方に液を送り戻す．
4．用意ができたら，スターラを適度な速さで回転させ，ペリスタポンプのスイッチを入れ，ミキシング管につけた目玉クリップをはずす．この際，低濃度アクリルアミド溶液が高濃度アクリルアミド溶液の中に流れ込んでくるか，確認する．流れ込んでくると，シュリーレンが観察される．流れ込んでくるのに若干のラグがあることもあるが，それはとくに問題ではないことが多い．スターラによっては，目玉クリップを外さないと回転子がうまく回転しないことがある．また，残液量が少なくなるに連れて，スターラの速度を徐々に落としていくと良い．送液速度は，スラブゲルの場合(10 mL＋10 mL)，10 分近くの時間をかけるのが良いようである．
5．ゲル液がすべてゲル板に注がれたら，あるいは所定の高さまで注がれたら，ペリスタポンプを止め，送液チューブをゲル板から外す．ゲル板の中のゲル液上面に，パスツールピペットを使って静かに純水を重層する．これは，ゲル液を空気（酸素）から遮断するためである．この際，ガラス板にゲル液が辿った痕がついているので，そこから注ぎ込むとゲル液の上面を乱さずに純水を重層することができる．一カ所から注ぐだけで，純水は左右に広がっていく．純水を注ぐのが苦手であれば，水を飽和させたイソブタノールを使うと，容易になる．しかし，この場合，余計な有機廃液が発生することになる．
6．過硫酸アンモニウム液と TEMED は，1 時間ほどでゲル化が完了する程度が良いようである．重層した純水とゲル液との境界が次第に不明瞭になるが，ゲル化が完了すると，重層した純水の下部が再び明瞭になる．また，ゲル底部とスペーサとの間にも明瞭な線が見られる．
7．分離ゲルができたら，濃縮ゲルを作成する．濃縮ゲルアクリルアミド溶液に過硫酸アンモニウム液を加えて攪拌し，次いで TEMED を加えて攪拌する．分離ゲルの上部の液体をアクリルアミド廃液入れに回収し，少量の上記濃縮ゲル液で共洗いする．共洗いを行わないと，分離ゲルと濃縮ゲルの境界に波状のシュリーレンが見えるゲルができる．共洗い後，濃縮ゲル液を適量注ぎ，サンプルコームを差し込む．この際，気泡が残らないように注意する．サンプルコームを水平に差し込むよりも，サンプルコームを傾けて片方を先に差し込み，その後徐々に水平になるように差し込んでいくと，気泡が押し出されていき，気泡が残りにくい．

ミキシング管は，スラブゲルを作る際は，内径 24 mm，高さ 55 mm の管のものを使っている．どこの電気泳動メーカでも作成してくれるであろうが，我々は日本エイドーに依頼している．

サンプルコームは，必要に応じ，ウェルの数を変えたものを作成している．N 末端配列解析の際や，抗原調製のためにタンパク質バンドを大量に回収したい場合，二次元電気泳動のための幅広のウェルが必要な場合など，12 連などのウェルがついたサンプルコームよりも，カーテン状の泳動を行った方がいいことがある．このような場合にも，サンプルコームを自作している．サンプルコーム用のテフロン板も，どこの電気泳動メーカからも可能であろうが，我々は日本エイドーから調達している．

## 6.a.3　サンプル処理

膜タンパク質を多く含む標品の場合，また，膜タンパク質をターゲットとした解析の場合，サンプル処理が重要である．多くの電気泳動の教科書には，熱処理を行うように記載されている．しかし，図 1 に示したように，変成処理液を加えた光化学系 II 複合体を 90 度で 5 分間熱処理すると，D1/D2 タンパク質，CP43/CP47 タンパク質の多くは凝集してしまって分離されなくなってしまう．多くの水溶性タンパク質は熱処理をしなくても充分に変性されるため，熱処理は必要ない．したがって，通常は，熱処理は行うべきではない．ただし，超好熱菌の LHC のように，熱処理などを行わないと変性されず，クロロフィル複合体のまま泳動された例もある．もっとも，我々の経験では，脂質除去処理によりその LHC も充分に変性させることができた．

### 6.a.3.1 脂質除去

低分子量タンパク質を解析する場合は，脂質除去処理を行う必要がある．これは，図1に示したように，多量に含まれる脂質とクロロフィルが低分子量タンパク質の分離を妨げるからである．脂質除去処理を行うことにより，低分子量域の分離が劇的に改善される．ただし，D1/D2タンパク質など，比較的分子量の大きな膜タンパク質が凝集し，分離ゲルに展開される量が減ってしまうものがある．

我々は，通常ジエチルエーテルを使って脂質除去を行っている．クロロフィル定量，あるいはタンパク質定量を行い，標品の泳動に必要な量を決める．処理量が30 μLを超える場合は，複数に分け，脂質除去処理終了後ひとつに合わせるようにする．これは，30 μL以上の水溶液ではジエチルエーテルと混和しないためである．30 μL以下の標品に100 μLのメタノールを加え，ボルテックスにより攪拌する．そして，1 mLのジエチルエーテルを加え，攪拌し，10,000 rpmで10分間，遠心する．ドラフト中で，パスツールピペットを使って上清を静かに取り除く．上清を除いたら，なるべく速やかに変性液を加え，バスタイプの超音波破砕器・ボルテックスを使って沈殿を溶解させる．乾燥してしまうと，変性液に溶解しづらくなることがままある．バスタイプの超音波破砕器で沈殿を溶解させる際は，キャビテーションポイントにサンプルチューブを配置するように注意する．どうしても沈殿が残る場合，サンプルチューブのふたを開けて氷上に静置し，少量残存しているジエチルエーテルを蒸発させると改善されることがある．この脂質除去処理は，エッペンドルフタイプのサンプルチューブで問題なく行うことができる．

### 6.a.3.2 タンパク質濃度が低い場合のサンプル処理

ゲル濾過後の標品を泳動する場合など，タンパク質濃度が低く，そのまま泳動サンプルとして調製することが困難な場合がある．泳動に必要な標品量が1 mL以下の場合，エッペンドルフタイプのサンプルチューブに標品を入れ，最終体積を1 mLになるように純水を加える．83 μLの98% TCAを加え，充分に攪拌し，10,000 rpmで15分間，遠心する．上清を捨て，変性液を加える．必要標品量が1 mL以上の場合，ファルコンチューブを使って同様に処理すると良い．必要があれば，脂質除去処理を行う．この際，変性液を加える前に上記のようにメタノールとジエチルエーテルを加えて，処理を行う．この脂質除去のために溶媒に沈殿を溶解させる際，バスタイプの超音波破砕器を使うと良いが，破裂する恐れがあるので充分な注意が必要である．ただし，TCA処理だけで脂質がある程度除去されるようで，改めて脂質除去処理を行う必要性は低い場合が多い．TCAが皮膚などに触れるとやけどを負うので，取り扱いには充分な注意が必要である．

### 6.a.3.3 サンプル量

標品の必要量を計算し，通常は，変性液と標品を等量ずつ混合し，泳動サンプルとする．目的，サンプルの状況によっては，上記のようにTCAによる濃縮や脂質除去のステップが必要になる．泳動サンプルは，スラブゲルの12連のコームの場合1ウエルあたり10 μLが適量である．そして，光化学系Ⅰ，Ⅱ標品やチラコイド膜では1ウエルあたり5 μg Chlが良いようである．その他の標品の場合，経験あるいは文献に当たるのが良いが，例えば，BSAをスラブゲルで泳動した場合，10 μg程度がCoomassie Blueで染色される充分なバンドになることがサンプル量を考慮する参考になるであろう．また，1ウェル分だけを処理するのはいろいろなステップでの作業がやりづらいので，標品に余裕があれば2～3ウェル分程度を調製するとよい．例えば，1,400 μg Chl/mLの標品の場合，10.7 μL(5 μg chl x 3ウェル分，15 μg Chl)をサンプルチューブに分注し，標品懸濁液を15 μLになるように加え，変性液を15 μL加えて（最終体積30 μL），10 μLを泳動する．TCA処理や脂質除去処理を行った場合，30 μLの変性液を加え，10 μLをロードする．

### 6.a.3.4 変性液の組成

我々の用いている変性液(ローディング液)は，40 mM DTT, 5.2% LDS, 172 mM Tris, 0.5 M sucrose, 0.01% pyronin Y，である．変性液を加えた泳動サンプルは，ローディングの時まで氷上に置いておく．高濃度のSDSは低温で析出しやすく，LDS(Lithium Dodecyl Sulfate)の方が低温での溶解度が高いので，LDSを用いている．pyronin Yは赤色の色素で，泳動の状況を確認するためのものである．Pyronin Yは現在ではSigmaから手に入れることが可能であるが，BPB（bromophenolblue）でも良い．sucroseは，泳動サンプルの密度を上げるために加えてある．尿素入りのゲルでは，サンプルをロードしている間にも尿素がウェル内の泳動バッファに溶け出してウェル内の密度が上がり，サンプルのローディングがうまく行かないことがある．このような場合，sucroseによりサンプルの密度を上げておくと良い．グリセロールでも良い．このような変性液を適量調製し，サンプルチューブに500 μL程度ずつ分注して冷凍しておくと便利である．解凍・凍結を複数回繰り返しても，分離には問題ないようである．ただし，ヘム染色を行う場合，新

鮮な DTT が必要で，解凍を繰り返した変性液は不適である．また，そのような変性液では，ヘム蛋白質（PsbV など）のバンドも不明瞭化しがちである．

#### 6.a.3.5　サンプルのローディング

両端のウェルを使ったレーンでは，バンドが歪みがちである．両端のウェルを使わない場合，サンプル量の 2 割増し程度（サンプル量が 10 μL であれば 12 μL）の変性液をこれらのウェルに入れてから泳動すると良い．このことにより，スカート状に裾が広がるのを抑えることができる．また同様に，全部のウェルを使わない場合，サンプルをロードしたウェル達の両側にサンプル量の 2 割増し程度の変性液を入れてから泳動すると，泳動結果がスカート状に裾広がりになるのを抑えることができる．

サンプルのローディングは，先端の細いチップをつけたマイクロピペッタあるはマイクロシリンジを使って行う．この際，チップの先端あるいはマイクロシリンジの針の先端をなるべくウェルの底近くに挿入し，静かにサンプルを吐出するようにすると良い．このようにすると，サンプルはウェルの底部でしっかりとした層になり，シャープなバンドを得やすい．溶け出してきた尿素のためにロードしづらくなった場合は，シリンジなどを使ってウェル内の溶液を吸い出すと良い．

### 6.a.4　各種の SDS-PAGE 系

#### 6.a.4.1　Mes/Tris の系[10)]

以下のように，ストック溶液を調製する．いずれも室温で保存する．未重合のアクリルアミドは高い神経毒性があるので，取り扱いには充分な注意が必要である．また，アクリルアミドを含む廃液は回収し，ゲル化させてから廃棄する．

ストック溶液（いずれも室温保存）

分離ゲル用アクリルアミド溶液（0.5% ビス）

49.5%(w/v) アクリルアミド，

0.5%(w/v) メチレンビスアクリルアミド

濃縮ゲル用アクリルアミド溶液

29.2%(w/v) アクリルアミド，

0.8%(w/v) メチレンビスアクリルアミド

分離ゲル用緩衝液；pH の調製は行わない

0.65 M Mes，3 M Tris，0.5%(w/v) SDS

濃縮用緩衝液

0.625 M Tris-HCl(pH 6.8)，1 %(w/v) SDS

電極液（Laemmli の系と同じ．ワーキング溶液）

25 mM Tris，0.192 M Glycine，0.1%(w/v) SDS

10%過硫酸アンモニウム液は，小分けして冷凍しておくと便利である．凍結・融解を繰り返しても，通常は差し支えない．ただし，融解後は氷上に静置する．アクリルアミド濃度勾配ゲルを作成するには，表 1 にしたがってアクリルアミドゲル溶液を調製し，先述の 6.a.2「アクリルアミド濃度勾配ゲルの作成」にしたがって，ゲルを作成する．アクリルアミドゲル溶液を脱気する必要はない．10% 過硫酸アンモニウムの量は，外気温により調節が必要な場合もある．アクリルアミド均一濃度のゲルを作成するには，表 2 を参考にゲル溶液を調製する．いずれの場合も，アクリルアミド濃度を変更するときは，分離ゲル用緩衝液および尿素の量をそのままにして，50%アクリルアミド溶液と純水の量を調節する．尿素の濃度を変更するときは，表 3 の尿素濃度と液体の関係を参考にして，調節する．

アクリルアミド均一濃度のミニゲルを作成するには，表 2 を参考にして，分離ゲル液の最終体積が 10 mL になるようにする．

**表 1**：Mes/Tris の系での 6 M Urea，18−24%アクリルアミドゲル溶液（スラブゲル）

| | アクリルアミド溶液 | | |
|---|---|---|---|
| | 18% | 24% | Stacking |
| 50% アクリルアミド | 3.6 mL | 4.8 mL | − |
| 30% アクリルアミド | − | − | 1.6 mL |
| 分離用ゲル緩衝液 | 2 mL | 2 mL | − |
| 濃縮用ゲル緩衝液 | − | − | 1.6 mL |
| 尿素 | 3.6 g | 3.6 g | 2.9 g |
| 純水 | 1.9 mL | 0.7 mL | 2.8 mL |
| (体積) | (10 mL) | (10 mL) | (8 mL) |
| 10%過硫酸アンモニウム | 12 μL | 8 μL | 40 μL |
| TEMED | 4.5 μL | 4.5 μL | 9.0 μL |

**表 2**：Mes/Tris の系での 6 M Urea，24%均一アクリルアミドゲル溶液（スラブゲル）

| | アクリルアミド溶液 | |
|---|---|---|
| | 24% | Stacking |
| 50% アクリルアミド | 9.6 mL | − |
| 30% アクリルアミド | − | 1.6 mL |
| 分離用ゲル緩衝液 | 4 mL | − |
| 濃縮用ゲル緩衝液 | − | 1.6 mL |
| 尿素 | 7.2 g | 2.9 g |
| 純水 | 1.4 mL | 2.8 mL |
| (体積) | (20 mL) | (8 mL) |
| 10%過硫酸アンモニウム | 20 μL | 40 μL |
| TEMED | 9.0 μL | 9.0 μL |

**表3**：一定体積の尿素含有溶液を調製する際の尿素量および液体量

| | 尿素 | 液体 | 最終体積 |
|---|---|---|---|
| 2 M 尿素 | 12.01 g | 90.93 mL | 100 mL |
| 4 M 尿素 | 24.02 g | 82.02 mL | 100 mL |
| 6 M 尿素 | 36.04 g | 74.86 mL | 100 mL |
| 8 M 尿素 | 48.05 g | 63.97 mL | 100 mL |

アクリルアミドゲル溶液を調製する際は，アクリルアミドストック溶液，ゲル緩衝液，純水の合計量を上記の液体量として考える．

泳動は，電源にも拠るが，6 M 尿素を含むスラブゲルで，180 mA*h 程度である（12 mA 定電流で約 15 時間）．最近の電子回路型の電源装置では，低めの仕事量になるようである（約 160 mA*h）．泳動度の再現性を得るためには，いつも同じくらいの電流値で泳動するのが良い．

### 6.a.4.2　3 M Tris の系[7]

以下のように，ストック溶液を調製する．いずれも室温で保存する．未重合のアクリルアミドは高い神経毒性があるので，取り扱いには充分な注意が必要である．また，アクリルアミドを含む廃液は回収し，ゲル化させてから廃棄する．これらのストック溶液は，低温で保存すると析出する可能性が高い．冬季気温の低い部屋では注意を要する．

ストック溶液（いずれも室温保存）
- 分離ゲル用アクリルアミド溶液
  - 60%（w/v）アクリルアミド，
  - 0.8%（w/v）メチレンビスアクリルアミド
- 濃縮ゲル用アクリルアミド溶液
  - 30%（w/v）アクリルアミド，
  - 1.6%（w/v）メチレンビスアクリルアミド
- 分離ゲル用緩衝液
  - 3 M Tris-HCl（pH 8.8），0.5%（w/v）SDS
- 濃縮用緩衝液
  - 1.25 M Tris-HCl（pH 6.8），1 %（w/v）SDS
- 電極液（Laemmli の系と同じ．ワーキング溶液）
  - 25 mM Tris，0.192 M Glycine，0.1%（w/v）SDS

分離ゲル用緩衝液を調製する際には，充分に時間をかけて pH を調整する必要がある．塩酸を加えることにより，温度が上昇し，その状態で目的の pH に合わせても，実際に使用するときには pH がずれている可能性がある．そうすると，低分子量域に於いては期待通りの分離を得ることができない．実際に泳動を行ってみて分離状況が不充分であれば，pH の再調整を行う．

表 4 にしたがってアクリルアミドゲル溶液を調製し，先述の「アクリルアミド濃度勾配ゲルの作成」にしたがって，ゲルを作成する．アクリルアミドゲル溶液を脱気する必要はない．10% 過硫酸アンモニウムの量は，外気温により調節が必要な場合もある．

**表4**：3 M Tris の系での 7.5 M Urea，16－24%アクリルアミドゲル溶液（スラブゲル）

| | アクリルアミド溶液 | | |
|---|---|---|---|
| | 16% | 22% | Stacking |
| 50% アクリルアミド | 2.67 mL | 3.67 mL | － |
| 30% アクリルアミド | － | － | 0.8 mL |
| 分離用ゲル緩衝液 | 2 mL | 2 mL | － |
| 濃縮用ゲル緩衝液 | － | － | 0.8 mL |
| 尿素 | 4.5 g | 4.5 g | 3.6 g |
| 純水 | 2.1 mL | 1.1 mL | 2.1 mL |
| （体積） | （10 mL） | （10 mL） | （8 mL） |
| 10%過硫酸アンモニウム | 20 μL | 15 μL | 40 μL |
| TEMED | 4.5 μL | 4.5 μL | 9.0 μL |

泳動は，電源にも拠るが，スラブゲルで，180 mA*h 程度である（12 mA 定電流で約 15 時間）．最近の電子回路型の電源装置では，低めの仕事量になるようである（約 160 mA*h）．泳動度の再現性を得るためには，いつも同じくらいの電流値で泳動するのが良い．

### 6.a.4.3　Tris/Tricine の系[8]

文献[9]にプロトコルが改めて紹介されている．

以下のように，ストック溶液を調製する．いずれも室温で保存可能である．未重合のアクリルアミドは高い神経毒性があるので，取り扱いには充分な注意が必要である．また，アクリルアミドを含む廃液は回収し，ゲル化させてから廃棄する．

ストック溶液（いずれも室温保存）
- AB-3 Mix
  - 49.5% T, 3% C
    - 48%（w/v）アクリルアミド，
    - 1.5%（w/v）メチレンビスアクリルアミド
- AB-6 Mix
  - 49.5% T, 6% C
    - 46.5%（w/v）アクリルアミド，
    - 3.0% メチレンビスアクリルアミド
- ゲル緩衝液（3 x）
  - 3 M Tris-HCl（pH 8.45），0.3%（w/v）SDS
- 陽極液（Anode buffer, 10）
  - 0.2 M Tris-HCl（pH 8.9）
- 陰極液（Cathode buffer）
  - 0.1 M Tris，0.1 M Tricine，0.1%（w/v）SDS

表 5 にしたがってアクリルアミドゲル溶液を調製す

**表5**：Tris/Tricine の系でのアクリルアミドゲル溶液の調製（スラブゲル）

| | 分離ゲル (16.5%T, 6%C) | スペーサゲル (10%T, 3%C) | 濃縮ゲル (4%T, 3%C) |
|---|---|---|---|
| AB-3 Mix | − | 1.22 mL | 0.40 mL |
| AB-6 Mix | 6.68 mL | − | − |
| ゲル緩衝液 | 6.68 mL | 2.0 mL | 1.24 mL |
| グリセロール | 2.68 g | − | − |
| 純水 | 4.5 mL | 2.78 mL | 3.36 mL |
| (総量) | (20 mL) | (6.0 mL) | (5.0 mL) |
| 10%過硫酸アンモニウム | 66.8 μL | 24 μL | 40 μL |
| TEMED | 7.5 μL | 4.8 μL | 4 μL |

る．アクリルアミドゲル溶液を脱気する必要はない．分離ゲル液をゲル板に注ぎ（スラブゲルの場合，スペーサゲルと濃縮ゲル，サンプルウェルのために，3〜5 cm 程度の空間を上に残す），すぐにスペーサゲル液をその上に静かに重層する（1〜2 cm の高さ）．そして，そのスペーサゲル液の上に純水を静かに重層し，ゲル化が完了するのを待つ．ゲル化したら，濃縮ゲル（コーム先端からスペーサゲルとの境界までが 1〜2 cm の高さ）を作る．

ゲルをセットし，サンプルをロードする．サンプル量は，10 μL 程度までに抑えた方がよいようである．サンプルが濃縮ゲルに入りきるまで，30 V を印加し，その後は 90 V で最後まで泳動する．表 5 に示したスラブゲルの条件で，約 24 時間を要する．分離ゲルにタンパク質が到着したときには 90 mA 程度の電流が流れるが，次第に電流量は減少し，泳動終了時には 10 mA 程度になる．ゲルの温度が 40°C以上にならないようにする．そのために 4 °C で泳動を行ってもよいであろう．ゲルの厚みによってはより高い電圧を印加することもでき，より短時間で終了する[9]．

ミニゲルでもスペーサゲルを通過するまで 90 V で泳動し，分離ゲル中で 105 V 電圧をかけた場合，約 6 時間を要する．分離ゲルにタンパク質が到着して 105 V の電圧をかけたときに約 40 mA 程度の電流が流れるが，泳動終了時には 10 mA 程度にまで徐々に減少する．

### 6.a.4.4 Laemmli の系[11]

Laemmli により報告され，最も広く利用されている系である．以下のように，ストック溶液を調製する．いずれも室温で保存可能である．未重合のアクリルアミドは高い神経毒性があるので，取り扱いには充分な注意が必要である．また，アクリルアミドを含む廃液は回収し，ゲル化させてから廃棄する．

ストック溶液（いずれも室温保存）

30% アクリルアミド溶液

29.2%(w/v) アクリルアミド，

0.8%(w/v) メチレンビスアクリルアミド

40% アクリルアミド溶液

38.9%(w/v) アクリルアミド，

1.1%(w/v) メチレンビスアクリルアミド

分離用ゲル緩衝液

1.5 M Tris-HCl(pH 8.8)，0.4%(w/v) SDS

濃縮用ゲル緩衝液

0.5 M Tris-HCl(pH 6.8)，0.4%(w/v) SDS

電極液（ワーキング溶液）

25 mM Tris，0.192 M Glycine，0.1%(w/v) SDS

表 6 に「5 M 尿素，13.5%均一アクリルアミドゲル溶液（ミニゲル）」のゲル液組成を示した．スラブゲルであれば，分離ゲル液を 20 mL 調製すればよい．また，表 7 に「6 M Urea，12–18%アクリルアミドゲル溶液（スラブゲル）」の例を示した．先述の「アクリルアミド濃度勾配ゲルの作成」にしたがって，ゲルを作成する．アクリルアミドゲル溶液を脱気する必要はない．アクリルアミド濃度を変更するときは，分離用ゲル緩衝液および尿素の量をそのままにして，アクリルアミド溶液と純水の量を調節する．尿素の濃度を変更するときは，表 3 の尿素濃度と液体の関係表を参考にして，調節する．

**表6**：Laemmli の系での 5 M尿素，13.5%均一アクリルアミドゲル溶液（ミニゲル）

| | アクリルアミド溶液 | |
|---|---|---|
| | 13.5% | Stacking |
| 30%アクリルアミド | 4.5 mL | 1.6 mL |
| 分離用ゲル緩衝液 | 2.5 mL | − |
| 濃縮用ゲル緩衝液 | − | 2.0 mL |
| 尿素 | 3.0 g | 2.4 g |
| 純水 | 0.80 mL | 2.6 mL |
| (体積) | (10 mL) | (8 mL) |
| 10%過硫酸アンモニウム | 28 μL | 40 μL |
| TEMED | 5.0 μL | 9.0 μL |

表 7：Laemmli の系での 6M Urea，12–18%アクリルアミドゲル溶液（スラブゲル）

| | アクリルアミド溶液 | | |
|---|---|---|---|
| | 12% | 18% | Stacking |
| 40%アクリルアミド | 3.0 mL | 4.5 mL | − |
| 30%アクリルアミド | − | − | 1.6 mL |
| 分離用ゲル緩衝液 | 2.5 mL | 2.5 mL | − |
| 濃縮用ゲル緩衝液 | − | − | 1.6 mL |
| 尿素 | 3.6 g | 3.6 g | 2.9 g |
| 純水 | 2.0 mL | 0.5 mL | 2.8 mL |
| （体積） | （10 mL） | （10 mL） | （8 mL） |
| 10%過硫酸アンモニウム | 20 μL | 15 μL | 40 μL |
| TEMED | 5.0 μL | 5.0 μL | 9.0 μL |

[均一アクリルアミド濃度ゲルの作製]

分離ゲルの作成

1．分離用ゲル液に過硫酸アンモニウムを加えてあまり泡を立てないように混ぜた後，TEMED をさらに加え，注意しながら混ぜる．

2．組み立てたゲル板のなかに(1)の液を静かにそそぎ込む．ガラス板の上端から約 3 cm のところまで入れる（残ったゲル溶液は必ずゲル廃液入れに入れる）．

3．純水をパスツールピペットを用いて静かに重層する（約 5 mm の高さ）．純水を重層するのが難しい場合は，水を飽和させたイソブタノールを用いる．

4．1 時間ほど静置する．アクリルアミドが重合するとゲルの界面が水（イソブタノール）層の下に鮮明に見えるようになる．

濃縮用ゲルの作製

1．分離ゲルの重合が完了したらゲル上面の水（イソブタノール）を流し出す．

2．過硫酸アンモニウムを濃縮用ゲル液に加えて手早く混ぜた後，TEMED をさらに加え，あまり泡を立てないように注意しながら混ぜる．分離ゲルと違って急速にゲル化するので素早く行う必要がある．

3．作製した分離用ゲルの表面を少量の濃縮用ゲル液で共洗いする．

4．濃縮用ゲル液を切れ込みのところまで注ぎ込む．

5．コームの下に気泡が残らないように注意しながら，ゲル板の間にコームを差し込む．重合が完了するとコームの歯の周辺に境界線が見えてくる．

図 3 に示した電気泳動像は，5 M 尿素，13.5%均一アクリルアミドゲル溶液（ミニゲル）のゲルを使い，35 mA 定電流で約 1 時間泳動したものである．表 7 に示したようなスラブゲルの場合，180 mA*h 程度である（12 mA 定電流で約 15 時間）．最近の電子回路型の電源装置では，

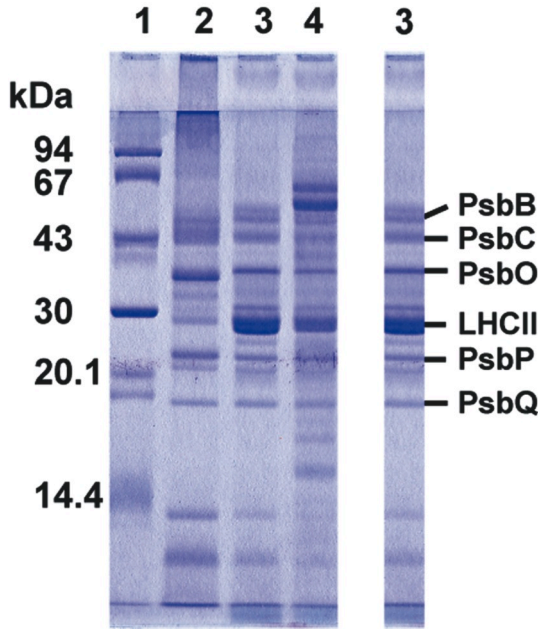



図 3：Laemmli の系での分離パターン．
5 M 尿素，13.5%均一アクリルアミドゲル溶液（ミニゲル）のゲルを使い，35 mA 定電流で約 1 時間泳動した．Lane 1，分子量マーカ；Lane 2，ホウレンソウの光化学系 II コア複合体；Lane 3，ホウレンソウ BBY 標品；Lane 4，ホウレンソウ葉緑体．

低めの仕事量になるようである（約 160 mA*h）．泳動度の再現性を得るためには，いつも同じくらいの電流値で泳動するのが良い．

## 6.a.5 検出法

### 6.a.5.1 Coomassie Blue（CBB）染色

SDS-PAGE 後のタンパク質の検出に広く使われている染色法である．いっぱんには Coomassie Blue R-250 が用いられる．検出限界はタンパク質にも拠るが 8–16 ng である．ダイナミックレンジは，125–1000 ng[12] である．使い捨てが一般的であるが，廃液を減らすために数回の再使用も可能である．染色液の組成は，0.15%(w/v) Coomassie Blue R-250，50%(v/v)メタノール，10%(v/v)酢酸である．泳動後のゲルを染色液に浸し，約 1 時間振とうする．染色時間が長くなっても，一般的には問題はない．温めた純水を使って染色液を調製すると，染色時間を短くすることができる．脱色液の組成は，25%(v/v) メタノール，7%(v/v) 酢酸である．キムワイプ(ティシュペーパ)を紙縒状にし，ゲルに重ならないように入れておくと，キムワイプが Coomassie Blue を吸着する．キムワイプを取り替えながら脱色を進めていく．脱色液も，温めた純水を使って調製すると，脱色の時間

を短縮することができる．

### 6.a.5.2　ゲルの乾燥

Coomassie 染色や後述の銀染色後，ゲルを乾燥して保存することができる．乾燥中にゲルが割れるのを防ぐために，グリセロール液に浸してから乾燥を行うことが勧められている場合がある．しかし，我々の経験では，充分に脱イオン水に置換した後，比較的低温（50 度程度）で乾燥すれば，割れることなく無事に乾燥が終了する．

乾燥は，濾紙の上にゲルを載せ，セロファンやラップをかぶせた上で行う．乾燥後，ラップははがされるが，セロファンはゲルに密着するので，セロファンを使う際には気泡を除いておく必要がある．

また，ゲルの両面をセロファンで乾燥すると，後々MS 分析をしたいと思ったときに便利である．目的のバンド・スポットを切り出しやすく，また，純水でゲル状に戻しやすい．目的のバンド・スポットを切り出した後，エッペンドルフチューブなどに純水を入れ，その中に切り出したゲル片を入れると，ゲルが膨潤し，セロファンも自然に剝がれる．この膨潤したゲル片で通常のゲル内消化を行い，MS 分析サンプルにすることができる[6]．濾紙を台紙にして乾燥した場合も同様に MS 分析に用いることができるが，膨潤したゲル片から濾紙の繊維を取り除くのに手間取ることが多い．

### 6.a.5.3　銀染色

Coomassie Blue では染色できないほどの微量のタンパク質でも染色することが可能である．検出限界は，タンパク質にも拠るが，0.5 ng 程度[13] である．ダイナミックレンジはそれほど広くなく，4–60 ng 程度の間で染色度の線形性が得られる[12]．染色キットが市販されているが，我々は以下の手順で染色している．大きめのバットで操作すると，染色ムラを少なくすることができる．なお，この方法で染色したタンパク質バンド・スポットは，MS 分析に用いることができる．また，Coomassie Blue で染色・脱色した後のゲルでも，引き続き銀染色を行うことができる．廃液は，研究機関の規則に従って処理を行う．

[染色方法]

1．ゲルを 40%（v/v）エタノール，10%（v/v）酢酸を含む溶液で，少なくとも 30 分間，平衡化させる．Coomassie Blue 染色後に充分に純水に平衡化させたゲルであれば，このステップは省略する．
2．純水で，数回洗う（10 分， 3 回程度）
3．320 μM DTT 溶液（32 μL 1 M DTT/100 mL）に約 30 分間，平衡化させる．Coomassie Blue で染色した後のゲルであれば，この DTT 溶液での平衡化を行わないと，発色されない．
4．0.2% $AgNO_3$ 溶液（0.2 g/100 mL）で 30 分の平衡化．
5．純水でゲルを数回洗う．このステップは必ずしも必要でないが，このステップを入れた方が仕上がりが綺麗である．
6．発色液（15 g $Na_2CO_3$，0.25mL HCHO/500mL）を加える．この際，染色ムラを防ぐため，ゲルの上面・下面に速やかに，なるべく均等に行き渡るようにする．
7．染色具合を確認しつつ，静かに振とうし，適度な発色が得られたら反応停止液（10%（v/v）酢酸）と交換する．
8．反応停止液にしばらく平衡化させる．
9．発色が強すぎてバックグランドが濃くなりすぎたら，Farmer's reducer（0.19 g FeCN，2.4 g $Na_2$-thiosulfate/250 mL）に浸し，振とうする．適度なバックグランドになったら，速やかに純水と交換し，数回洗う．Farmer's reducer に長時間浸すと，すべてが脱色されてしまう．
10．純水に平衡化した後，スキャナで画像化する，MS 分析のサンプル処理を行う，乾燥する，等の処理を行う．

### 6.a.5.4　SYPRO Ruby や Flamingo による検出

蛍光検出装置の普及により，SYPRO Ruby や Flamingo 等による検出が容易に行われるようになってきた．これらの手法による検出限界は銀染色と同程度であり[13]，また，ダイナミックレンジは 1–1000 ng と[12)13]，銀染色と Coomassie Blue 染色の両方をカバーする．操作は Coomassie Blue と同様，いたって簡便である．泳動後のゲルを染色液に 3 時間程度平衡化させ，蛍光イメージング装置で画像化する．特定のバンド・スポットを切り出すためには，専用の装置が必要となる．これらの手法で染色したゲルも，改めて Coomassie Blue で染色することができるので，必要があれば Coomassie Blue 等で染色し直してバンド・スポットを切り出すということも可能である．

### 6.a.5.5　フィコビリンタンパク質の検出

ラン色細菌や紅藻など，フィコビリゾームを含む材料を取り扱う場合，フィコビリンタンパク質を感度良く検出できると便利である．電気泳動後のゲルを，トランスイルミネータに載せ，紫外線を照射することで，フィコビリンタンパク質を発色させることができる．また，硫酸亜鉛（$ZnSO_4$）溶液を使うことで検出感度を高くする方法も報告されている[14–16]．この方法では，色のついてい

ないリンカータンパク質も検出することが可能である．

### 6.a.5.6　ヘム染色

光合成電子伝達系の構成成分として知られている *c* 型シトクロムがある．多くの酸素発生型非緑色光合成生物の光化学系Ⅱ複合体に結合している PsbV（cyt *c*550）や，シトクロム *b*6/*f* 複合体のシトクロム *f* 等である．これらのタンパク質バンドを電気泳動後に定量的に検出する場合，ヘム染色が有効である．ただし，ヘムタンパク質ごとに染色度が異なるので[17]，異なるヘムタンパク質間の量的な比較は困難である．また，とくに注意すべき点は，タンパク質の変性液に含まれる DTT（dithiothreitol）は新鮮でないといけないということである．通常の SDS-PAGE では，変性液の凍結・融解を繰り返していても大きな問題はないようであるが，ことヘム染色に関しては DTT の鮮度は大きな問題である．新鮮な DTT でないと，ヘム染色されないばかりか，Coomassie Blue で染色したヘム蛋白質のバンドも不鮮明になることもある．ここでは，蛍光イメージング装置を使った検出法（ECL 法[17]）と，Diaminobenzidine（DABZ）を使った方法とを紹介する．ECL 法では，引き続いてウェスタンブロットを行うことができる．ウェスタンブロットのついでにヘム染色を行うことができるわけである．また，ECL 法では，DABZ 廃液も生じない．

#### [ECL 法][6,18]

ECL 反応液を用意する．我々は，Pierce 社の West-Femto を使っている[19]．同じ会社の WestPico では感度が不充分なことが多い．

1．SDS-PAGE 後，あるいは Native PAGE 後，Western blotting の方法により，PVDF 膜にブロットする．
2．ブロット終了後，PVDF 膜を軽く純水で洗う．そして OHP フィルム上に WestFemto（Pierce 社）を適量，混合し，PVDF 膜の両面を反応液になじませる．そして，気泡を挟まないように，OHP フィルムを被せる（OHP フィルムで PVDF 膜を挟む）．ラップでも可能であるが，反応液のムラを除くためには OHP フィルムが良い．
3．蛍光イメージング装置で画像を取り込む．または，X線フィルムに感光させ，現像する．
4．PVDF 膜をアミドブラック（0.1%（w/v）Amido black-10B，10%（v/v）メタノール，2%（v/v）酢酸）で染色し，スキャナで画像化する．脱色は，純水のみで行う．
5．必要であれば，ウェスタンブロットに進む．

#### [DABZ 法]

1．SDS-PAGE の終了したゲルを純水で約 20 分，振とう．途中，純水を数回，交換する．
2．純水で平衡化している間に，水 50 ml に対して 0.2 g の 3,3'-Diaminobenzidine　Tetrahydrochloride（DABZ-4HCl）を溶かし，それにメタノール 25 ml と Citric Buffer（1 M citrate-NaOH/pH 4.7）25 ml を加えたものを調製しておく．
3．純水を捨て，上記 DABZ 液に置換し，1 時間程度の振とうを行う．
4．終濃度 2 %となるように過酸化水素水を加え，発色させる．
5．充分に発色させた後，純水で数回の洗浄を行う．

### 6.a.5.7　ウェスタンブロット[20]

SDS-PAGE や Native-PAGE で分離したタンパク質を特異的な抗体を用いて検出・同定する方法である．スウェーデンの AgriSera（http://www.agrisera.se/）が光合成関連の抗体を各種取り揃えている．

電気泳動後，PVDF 膜やニトロセルロース膜にタンパク質を転写し，BSA やスキムミルク等でブロッキングを行った後，特異的な抗体（一次抗体），二次抗体と反応させ，二次抗体に結合させた HPR などの活性を利用して検出を行う．一次抗体は通常，数百倍に希釈して使用し，再使用することが多い．この場合，防腐剤が必要である．一般的には，HRP 結合の二次抗体を使用する場合，アジ化ナトリウムはその活性を阻害するために一次抗体の保存にもアジ化ナトリウムは使ってはならないことになっている．しかし，一次抗体を反応させた後，PVDF 膜（ニトロセルロース膜）を充分に洗浄するため，防腐剤としてアジ化ナトリウムが入っていたとしても二次抗体を作用させる前に洗い流されるようで，実際問題としてはアジ化ナトリウムの使用は問題ない．アルカリフォスファターゼ結合の二次抗体の場合も，同様であろう．

ブロッティング終了後，前述のヘム染色操作（ECL 法）で *c* 型シトクロムの検出を行ってからウェスタンブロットを進めることが可能である．

#### [実験方法]

予め用意しておく溶液．

TBSX solution
　20 mM Tris-HCl（pH 7.5），0.5 M NaCl，0.1% Triton X-100
　（バックグランドの低減のためには，ナカライの Triton X-100 が良いようである）

Blocking solution

1% BSA in TBSX

Antibody buffer

1% BSA/TBSX

Blotting buffer（Transfer buffer）

0.1 M Tris，0.192 M Glycine，5% Methanol，0.02% SDS

BSA の代わりにスキムミルクを使うこともできる．

[操作]

1．電気泳動を行う．

・試料タンパク質量は Coomassie Blue 染色の場合の 1/5 から 1/10 でよい．

2．電気泳動終了後，ゲルを切り出し，Blotting buffer に浸して振とうする．

3．ゲルを振とう・平衡化し始めて 15 分ほど経ったら，ゲルを採寸する．

平衡化中にゲルが伸張する場合は，しばらく浸漬してから採寸するとよい．アクリルアミド濃度勾配ゲルの場合は，ゲルの下端側が若干伸張しやすいようである．

4．この大きさに合わせて PVDF 膜（ニトロセルロース膜）（1 枚）と厚手の濾紙（8 枚）を切り出す．PVDF 膜（ニトロセルロース膜）や濾紙は，ゲルよりも 5 mm 以上は大きくないように切り出す．

5．切り出した PVDF 膜を 100%メタノールに浸す．短時間でよいが，ムラなく浸す．ニトロセルロース膜の場合，必要ない．

6．メタノールを Blotting buffer に置換し，振とうしながら浸漬する．置換後すぐは注意深く攪拌し，Blotting buffer に馴染ませるようにする．なるべく空気に触れないようにしないと，転写後の膜への保持効率が悪くなるようである．

7．セミドライタイプの転写装置の下部電極板に Blotting buffer をむらなく広げる．

8．この電極板の上に，Blotting buffer に浸しておいた濾紙を 1 枚ずつ 4 枚重ねる．このとき気泡が濾紙と電極板の間，および濾紙と濾紙の間にできないように，濾紙の下の空気を押し出すように濾紙を載せていく．

9．4 枚重ね濾紙の上に PVDF 膜を気泡ができないように素早く重ね，また素早くその膜の上に Blotting buffer を注ぐ．

10．気泡が入らないようにゲルを載せる．このとき，できるだけゲルの裏表を確認して載せる．転写後 PVDF 膜をレーンに合わせて切り出す必要がある場合，後で切りわけ易いように，膜の上にレーンの境目を鉛筆で印をつけておくとよい．

11．さらに，Blotting buffer をゲルの上に小量注ぎ，Blotting buffer に浸しておいた濾紙を先ほどと同様に 1 枚ずつ 4 枚重ねる．

12．さらに Blotting buffer を少量注ぎ，次いで上部電極と濾紙との間に気泡が入らないように，注意深く上部電極を載せる．上部電極をやや傾けて載せると，気泡が押し出される．このような手順で行うと，濾紙の間などに気泡ができにくいので，上部電極を載せる前にローラーなどで気泡を押し出す操作をしなくて済み，また，Blotting buffer も濾紙などに充分保持される．

13．極性を確認して電源に繋ぎ，通電を始める．

・通電は，ゲル面積 1 $cm^2$ 当り 2.0 mA 定電流に設定し，約 45 分通電する．通電直後は 10 V 程度で，時間が経つにつれて電圧が高くなっていく．

・通電時間等はゲル，試料によって異なるので，条件設定をした方がいい場合もある．

14．終了後，必要に応じ，ヘム染色を行う．

15．アミドブラック，ポンソーなどで染色し，その後，脱色する．

16．スキャナで画像を記録する．

17．PVDF 膜（ニトロセルロース膜）を Blocking Solution に浸し，膜上のタンパク質がない部分をコーティングする．振盪しながら約 30 分．

18．一次抗体を反応させる．振盪しながら 30 分〜一晩．

19．反応後の PVDF 膜を TBSX で洗う．5 分間 x 4 回程度．

20．二次抗体（Horseradish Peroxidase-conjugated IgG）を反応させる．振盪しながら 30 分〜1 時間．1% BSA/TBSX で希釈して使う．

21．PVDF 膜を TBSX で洗う．5 分間 x 4 回程度．

22．OHP フィルムに ECL 液（Pierce 社の WestPico 等）を載せ，PVDF 膜（ニトロセルロース膜）の両面を反応液になじませる．そして，気泡を挟まないように，OHP フィルムを被せる（OHP フィルムで PVDF 膜を挟む）．

23．蛍光イメージング装置で画像を取り込む．または，X 線フィルムに感光させ，現像する．

24．必要に応じ，別の一次抗体を反応させる．この場合，前の一次抗体をはがすための処理もあるが，完全に取り除くことは難しい．

### 6.a.5.8 N 末端アミノ酸配列の解析

ウェスタンブロットと同様にして，ブロッティングを行い，アミドブラックなどで染色する．電気泳動の際，Tris/Glycine 系の泳動バッファを使わないようにとの

指示がある場合もあるが，問題ないようである（装置によるのかもしれない）．

Blotting buffer の組成は，50 mM Tris，30 mM Boric acid，0.02%(w/v) SDS，5%(v/v) methanol である．pH を調製していない 1 M　Tris 溶液と，0.5 M　Boric acid 溶液を用意しておくと，Blotting buffer の調製が容易である．

ゲル面積 1 $cm^2$ 当り 2.0 mA 定電流に設定し，約 45 分通電する．通電直後は 20 V 程度で，時間が経つにつれて電圧が高くなっていく．ブロッティング終了後はアミドブラック等で染色し，バンドを確認する．フォルミル化によるブロッキングを除くために，0.6 N HCl で一晩，インキュベーションを行っても良い．その場合は，純水で充分に洗浄を行う．

## 参考文献


1）Z. J. Lorkovic, W. P. Schroder, H. B. Pakrasi, K. D. Irrgang, R. G. Herrmann, & R. Oelmuller, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **92** (1995) P.8930.

2）Y. Kashino, T. Takahashi, N. Inoue-Kashino, A. Ban, Y. Ikeda, K. Satoh, & M. Sugiura, Biochim. Biophys. Acta **1767** (2007) P.1269.

3）N. Inoue-Kashino, T. Takahashi, A. Ban, M. Sugiura, Y. Takahashi, K. Satoh, & Y. Kashino, Photosynth Res **98** (2008) P.323.

4）Y. Kashino, W. M. Lauber, J. A. Carroll, Q. Wang, J. Whitmarsh, K. Satoh, & H. B. Pakrasi, Biochemistry **41** (2002) P.8004.

5）Y. Kashino, J. Chromatogr. B **797** (2003) P.191.

6）Y. Kashino, T. Harayama, H. B. Pakrasi, & K. Satoh, J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci **849** (2007) P.282.

7）M. Ikeuchi & Y. Inoue, Plant Cell Physiol. **29** (1988) P. 1233.

8）H. Schägger & G. von Jagow, Anal. Biochem. **166** (1987) P.368.

9）H. Schägger, Nat. Protoc. **1** (2006) P.16.

10）Y. Kashino, H. Koike, & K. Satoh, Electrophoresis **22** (2001) P.1004.

11）U. K. Laemmli, Nature **227** (1970) P.680.

12）K. Berggren, E. Chernokalskaya, T. H. Steinberg, C. Kemper, M. F. Lopez, Z. Diwu, R. P. Haugland, & W. F. Patton, Electrophoresis **21** (2000) P.2509.

13）J. C. Nishihara & K. M. Champion, Electrophoresis **23** (2002) P.2203.

14）T. R. Berkelman & J. C. Lagarias, Anal Biochem **156** (1986) P.194.

15）S. Raps, Plant Physiol **92** (1990) P.358.

16）T. Lamparter, F. Mittmann, W. Gartner, T. Borner, E. Hartmann, & J. Hughes, Proc Natl Acad Sci U S A **94** (1997) P. 11792.

17）C. Vargas, A. G. McEwan, & J. A. Downie, Anal Biochem **209** (1993) P.323.

18）Y. Kashino, N. Inoue-Kashino, J. L. Roose, & H. B. Pakrasi, J. Biol. Chem. **281** (2006) P.20834.

19）C. S. Beckett, J. A. Loughman, K. A. Karberg, G. M. Donato, W. E. Goldman, & R. G. Kranz, Mol Microbiol **38** (2000) P.465.

20）H. Towbin, T. Staehelin, & J. Gordon, Proc Natl Acad Sci U S A **76** (1979) P.4350.

# 6．タンパク質
## b. Blue-Native PAGE

菓子野康浩[1)]

光合成電子伝達系には，複数の膜タンパク質複合体が関与している．これらのタンパク質複合体を複合体のままで電気泳動するいわゆる Native-PAGE のひとつとして，近年，Blue-Native PAGE が頻繁に用いられるようになった．膜タンパク質複合体の構成を調べたり，単量体なのか二量体なのかを検証することなどが行われている．本稿では，Blue-Native PAGE を概観し，実験方法を簡単に紹介する．

## Blue-Native PAGE

Yasuhiro Kashino

Photosynthetic electron transport system contains several membrane protein complexes such as photosystems I and II.　Blue-Native PAGE is useful to assess the oligomeric form of membrane protein complexes and their composition in their native form.　In this section, outline of this electrophoresis system and the experimental procedure will be presented.

### 6.b.1　Blue-Native PAGE

光化学系 I 複合体，光化学系 II 複合体，シトクロム *b* 6/*f* 複合体，等，光合成電子伝達系では複数の膜タンパク質複合体が協調的に機能している．そのような膜タンパク質複合体のサブユニット組成を解明するためには，膜タンパク質複合体を精製し，精密な SDS-PAGE 等による解析[1)2)] や結晶化による構造解析[3)4)5)6)7)8)9)10)] が行われてきた．しかし，そのような方法では，多量に精製することが必要であり，また特定のサブユニットが精製の過程で遊離してしまう可能性も捨てきれない．さらに，膜タンパク質複合体は，常に離合集散しているダイナミックな存在であり[11)]，生理的な条件下での構築・修復過程を解明するためには，精製によるサブユニット組成の解析では非常な困難がある．このような問題を解決するひとつの方法として，近年汎用されるようになってきた手法が Blue-Native PAGE である[12,13)14)]．

上記のような目的や精製のために，従来，6 c 節で取り上げる Green-Native　PAGE と呼ばれるような Native PAGE が行われてきた．そのような Native PAGE では，界面活性剤により膜タンパク質を可溶化して電気泳動を行う．穏和な非イオン性界面活性剤が用いられることが多く，主に膜タンパク質複合体の持つ電荷に依存して複合体が泳動される．Blue-Native PAGE では，膜画分の可溶化は必要であるが，可溶化後の膜タンパク質複合体に Coomassie Blue G-250 を結合させ，Coomassie Blue G-250 の持つ負電荷により膜タンパク質複合体の泳動を行うものである．泳動により，タンパク質複合体およびゲルが青色を呈するため，Blue-Native PAGE と呼ばれる．Coomassie Blue G-250 は水への溶解性が大きく，一方，疎水的性質も備えているため膜タンパク質に結合することも可能である．そのため，Coomassie Blue G-250 を結合させた膜タンパク質は，界面活性剤により可溶化されたときと同じように可溶化状態にある．多量の Coomassie Blue G-250 が膜タンパク質複合体本来の電荷を覆ってしまうため，泳動バッファの pH は 7.5 であるが，塩基性タンパク質も正極に向かって泳動されることになる．電気泳動のための担体としては，アクリルアミド濃度勾配ゲルが用いられる．つまり正極に近いほど，ポアサイズが減少する．ポアサイズの減少に伴い，泳動中の膜タンパク質複合体の移動速度は減少していく．そして，タンパク質複合体の大きさに応じたポアサイズのところまで移動すると，そのタンパク質複合体の移動は停止する．このようにして，タンパク質・タンパク質複合体の大きさ（分子量）によって分離されることになる．

通常用いられる Coomassie Blue G-250 の濃度では，膜タンパク質複合体が解体される可能性は低いようで，複合体が複合体として泳動されることになる．そのため，Blue-Native PAGE 後に SDS-PAGE を組み合わせた二

1）兵庫県立大学大学院生命理学研究科

次元電気泳動を行うことにより，比較的存在量の少ない膜タンパク質複合体のタンパク質組成を調べることができるようになった．これは，近年ゲノム情報が蓄積されてきたことと，微量でもタンパク質の同定を可能にしたMS分析，N末端アミノ酸配列解析などの分析技術の進歩に負うところも大きい．Blue-Native PAGEとSDS-PAGEを組み合わせた二次元電気泳動を行うことにより，ラン色細菌 *Synehcocystis* sp. PCC 6803等を材料にして，チラコイド膜上に存在する膜タンパク質複合体のサブユニット組成が詳細に解析された例が頻繁に報告されている[15)16)17)]．タンパク質複合体は健全（native）な状態で泳動されるため，ゲル内での活性測定を行うこともでき，ブロッティングすることにより抗体を使って特定のタンパク質を検出することも可能である（ウェスタンブロット）．また，ゲルから抽出して色素分析などを行ったりすることが可能である．

また，この方法では，タンパク質複合体を分子量により明瞭に分離することができ，適切な分子量マーカを使うことにより，分子量を推定することも可能である．このことを利用して，精製した光化学系Ⅰ，光化学系Ⅱやシトクロム $b6/f$ 複合体のオリゴマー状態を決定することができる．Huangら[18)]は，シトクロム $b6/f$ 複合体が二量体であることを示すのにBlue-Native PAGEを行った．その後，結晶構造でも二量体構造であることが示された[9,10)]．我々は，珪藻の光化学系Ⅰ複合体が単量体であることをBlue-Native PAGEにより示した[19)]．Blue-Native PAGEによる分離は，ゲル濾過によるものよりもいっぱんに良好であるようだ．また，二次元目のSDS-PAGEへの展開が容易であるので，濃縮などの操作をせずに，分離された複合体のタンパク質組成を容易に検証することができるという利点もある．

このように非常に有用な手法であるが，注意すべき点もいくつかある．我々の経験では，光化学系Ⅱ複合体のPsbO, PsbU, PsbVなどの表在性タンパク質が遊離してしまっている．したがって，例えば光化学系Ⅱ複合体の修復・構築過程を解析する場合など，チラコイド膜上に小数存在する修復・構築過程にある複合体にそのような表在性タンパク質が実際に結合しているかどうかを容易には決定できないことになる．そのような表在性タンパク質を保持することができる条件を検討しなくてならないであろう．さらに，これはBlue-Native PAGEに限ったことではないが，異なるタンパク質複合体であっても，分子量が非常に似ていると，泳動度がほとんど同じになることがある．そのような場合でも，ゲルのアクリルアミド濃度勾配等の泳動条件を変えて泳動することにより，ある条件では重なってしまうタンパク質複合体を分離することができることもある．Blue-Native PAGEにより分離されたバンドから予想外のタンパク質組成が得られた場合，泳動条件を変えて解析してみることも必要であろう．また我々は，ショ糖密度勾配遠心により得られたタンパク質複合体のように，ショ糖が高濃度含まれた標品では，Blue-Native PAGEでの解析が困難になったことも経験している．さらなる条件の検討が必要であろう．

**[実験方法]**

Blue-Native PAGEは，Coomassie Blue G-250の性質を利用して泳動するものであるが，チラコイド膜などの膜画分での分析を行う場合，予め適切な濃度の適切な界面活性剤で可溶化する必要がある．可溶化のための界面活性剤としては，Digitonin, n-dodecyl-$\beta$-D-maltoside (DDM), Triton X-100等が用いられる．我々は次のようにして泳動のための可溶化条件を決定している．

1．1 mg Chl/mLのチラコイド膜に0.5〜1.2%程度の濃度範囲でDDMを加える．
2．暗所・氷上で20分間の処理を行う．
3．遠心により不溶物を除去する．
4．5 $\mu$g Chl相当量をBlue-Native PAGEで泳動し，適切な濃度条件を決定する．

光化学系Ⅰ複合体や光化学系Ⅱ複合体であれば，界面活性剤濃度の上昇にともない，バンドが鮮明になるとともに，泳動度が徐々に大きくなる．そのような変化がなくなる最低濃度に設定している．通常，1% DDMである．Herranenら[15)]は，*Synechocystis* sp. PCC 6803のチラコイド膜を材料に，0.5 mg Chl/mL，2% DDMで0 °C，60分の処理を行っている．Zhangら[16)]は，*Synechocystis* sp. PCC 6803のチラコイド膜を材料に，10 $\mu$g protein/$\mu$L，1.5% DDMで氷上10分の処理に引き続き室温で20分の処理を行っている．すでに報告されている条件を参考にして，材料や界面活性剤の種類に応じた適切な条件を検討すべきである．

精製した光化学系複合体などは，改めて界面活性剤による処理を行わず，下記のように5% Coomassie Blue G-250溶液を添加し，泳動サンプルとする．泳動の際，スラブゲルであれば，チラコイド膜や光化学系Ⅰ複合体は5 $\mu$g Chl相当量，光化学系Ⅱ複合体は2 $\mu$g Chl相当量が適量であるが，サンプルに応じて調節する．分子量マーカは，InvitrogenのNativeMark（http://www.invitrogen.co.jp/electro/lc0725.shtml）を使用している．サンプルのローディングを容易にするために，5%（w/v）

**表1**：Blue-Native PAGE のためのストック溶液

| Stock Solution | Composition |
|---|---|
| Deep Blue Cathode Buffer (pH 7.0) | 50 mM Tricine，7.5 mM Imidazole<br>0.02% Coomassie Blue G-250 |
| Slightly Blue Cathode Buffer (pH 7.0) | 50 mM Tricine，7.5 mM Imidazole<br>0.002% Coomassie Blue G-250 |
| Anode Buffer（pH 7.0） | 25 mM Imidazole-HCl |
| AB mix | 49.5%T，3%C<br>(48%(w/v) Acrylamide，<br>1.5%(w/v) methylenebisacrylamide) |
| Gel Buffer（pH 7.0） | 75 mM Imidazole-HCl<br>1.5 M 6-Aminocaproic acid |
| 5% CBB G-250 | 5%(w/v) Coomassie Blue G-250，<br>500 mM 6-Aminocaproic acid |

未重合のアクリルアミドおよびメチレンビスアクリルアミドは高い神経毒性を有するので，取り扱いに注意する．

グリセロールなどでサンプルの比重を高くしておくとよい．チラコイド膜や光化学系複合体の調製には通常ショ糖やグリセロールが含まれた溶液が用いられるので，そのような場合は，改めて加える必要はない．

Blue-Native PAGE のためのストック溶液の組成を表1に示した．表2に示したゲル条件は，光化学系Ⅰ複合体や光化学系Ⅱ複合体複合体を対象にして解析するために我々が用いているものである．Schägger によるプロトコル[13)14)]に，タンパク質複合体の大きさに応じた適切なアクリルアミド濃度勾配の例が挙げてあるので，それも参考に適切なアクリルアミド濃度勾配を決定すると良いであろう．6 a 節(SDS-PAGE)にアクリルアミド濃度勾配を作成する手順を記載してあるので，必要であればそれを参考にしてゲルを作成する．アクリルアミド均一濃度のゲルでも泳動は可能ではあるが，バンドが曖昧となり，正確さに欠けるようである．また，分子量の大きなタンパク質複合体を対象にする場合，表2に示した2.5%T のような低アクリルアミド濃度の濃縮ゲルを使うと良い．アクリルアミド濃度が高いと，分子量の大きなタンパク質複合体が濃縮ゲルにも入らない場合がある．2.5%T の濃縮ゲルは非常に柔らかいので，泳動終了後にゲル板を剝がす際は注意を要する．この濃度の濃縮ゲルは板状になっておらず，ゲル板を剝がす際に分離ゲルから剝がれてしまう．

未重合のアクリルアミドは高い神経毒性があるので，取り扱いには充分な注意が必要である．また，アクリルアミドを含む廃液は回収し，ゲル化させてから廃棄する．

1．ゲル溶液を調製し(表2)，アクリルアミド濃度勾配ゲルを作る．
2．ゲル液をゲル板に入れ終わったら，パスツールピペットを使って純水を静かに重層し，ゲル化するのを待つ．
3．分離ゲルがゲル化したら，濃縮ゲルを作りサンプルウェル用コームを気泡が残らないように差し込む．
4．サンプルにその 1/10 量の 5% CBB 溶液を加えて，よく混合する．
5．泳動槽の陽極側に Anode Buffer を入れ，ゲルを泳動槽にセットし，陰極側に Deep Blue Cathode Buffer を Stacking gel と Separation gel の境界付近まで入れる．
(ここで Deep Blue Cathode Buffer を途中までしか入れないのは，サンプルをロードしやすくするためである．最初からいっぱい入れてしまうと，Deep Blue Cathode Buffer の色が濃いため，サンプルウェルを確認しづらくなる．)
6．サンプルをロードする．5〜10 μL が適量である．分子量マーカ NativeMark は，スラブゲルの場合，5 μL が適量である．サンプルのローディングが終了したら，陰極側に Deep Blue Cathode Buffer を追加する．

**表2**：5-10%T アクリルアミド濃度勾配ゲルを作成するためのゲル液

| | Separation Gel | | Stacking Gel |
|---|---|---|---|
| | 5% T | 10% T | 2.5% T |
| AB mix | 1 mL | 2 mL | 0.15 mL |
| Gel Buffer | 3.25 mL | 3.25 mL | 1 mL |
| Glycerol | — | 2 g | — |
| Water | 5.75 mL | 2.75 mL | 1.85 mL |
| Total | 10 mL | 10 mL | 3 mL |
| 10% APS | 40-55 μL | 30-50 μL | 25 μL |
| TEMED | 4.0-5.5 μL | 4.0-5.0 μL | 2.5 μL |

APS，過硫酸アンモニウム

7．クロマトチャンバー，あるいは低温室（4°C）に泳動槽を水平に置き，電源と接続する．
8．Stacking gel を過ぎるまでは 60 V で泳動し，Separation gel に入ったら 300 V に電圧を上げる．この場合，泳動先端がゲル下端に達するのに，4 ～ 6 時間程度を要する．電圧を 60 V で維持した場合，20 時間程度である．
9．泳動の先端が Separation gel の 1/3 まで進んだら，いったん泳動を止め，陰極側の電極液を Slightly Blue Cathode Buffer に置き換える．
10．再び 300 V にして，泳動先端の CBB がゲルから流れ出るまで泳動する．
（あるいは，適切な泳動距離まで．）
11．泳動槽からゲルを取り出し，スキャナーでコンピュータに取り込む．
ゲルが破れやすいので，注意して取り扱う．
12．Coomassie Blue による染色・脱色後，スキャナーでコンピュータに取り込む．
13．必要に応じ，二次元目の泳動を行う．Coomassie Blue による染色を行わずに二次元目の SDS-PAGE を行っても良い．

泳動後のバンドからタンパク質複合体を抽出する場合など，泳動先端の Coomassie Blue G-250 がゲルの下端に到着する前に，目的のタンパク質複合体が充分に分離された段階で泳動を終了する．その方が，タンパク質複合体の抽出が容易である．

二次元目の泳動のためにレーンを切り出す際は，カッターナイフの刃を垂直に当て，押し切るようにすると切りやすい．そして，そのゲルストリップを変成液に 10～20 分程度，浸してから二次元目のゲルに載せる．Blue-Native PAGE の解析対象は膜タンパク質なので，二次元目の SDS-PAGE は，前節（6 a）に記載したように膜タンパク質の分離に適した系を選択すべきである．

Blue-Native PAGE をスラブゲルで行い，二次元目の SDS-PAGE も同じサイズのゲル板を使った場合，濃縮ゲルは最上部まで作製し，その上に Blue-Native PAGE のゲルストリップを載せるようにすると良い．その上で，0.5%アガロースで封入する．厚みの同じゲルストリップをゲル板の間に押し込むのは困難である．分子量マーカ等を同時に泳動する場合，分子量マーカを 0.5%アガロースで固化させ，適切な大きさに切り分けておく．このゲル片を濃縮ゲルの適切な場所に載せ，Blue-Native PAGE のゲルストリップと同時に 0.5%アガロースで封入するのも一つの方法である．

## 参考文献


1）M. Ikeuchi & Y. Inoue, Plant Cell Physiol. **29** (1988) P. 1233.
2）Y. Kashino, W. M. Lauber, J. A. Carroll, Q. Wang, J. Whitmarsh, K. Satoh, & H. B. Pakrasi, Biochemistry **41** (2002) P.8004.
3）P. Jordan, P. Fromme, H. T. Witt, O. Klukas, W. Saenger, & N. Krauss, Nature **411** (2001) P.909.
4）A. Amunts, O. Drory, & N. Nelson, Nature **447** (2007) P.58.
5）N. Kamiya & J.-R. Shen, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **100** (2003) P.98.
6）K. N. Ferreira, T. M. Iverson, K. Maghlaoui, J. Barber, & S. Iwata, Science **303** (2004) P.1831.
7）B. Loll, J. Kern, W. Saenger, A. Zouni, & J. Biesiadka, Nature **438** (2005) P.1040.
8）K. Kawakami, M. Iwai, M. Ikeuchi, N. Kamiya, & J. R. Shen, FEBS Lett **581** (2007) P.4983.
9）G. Kurisu, H. Zhang, J. L. Smith, & W. A. Cramer, Science **302** (2003) P.1009.
10）D. Stroebel, Y. Choquet, J. L. Popot, & D. Picot, Nature **426** (2003) P.413.
11）P. J. Nixon, M. Barker, M. Boehm, R. de Vries, & J. Komenda, J Exp Bot **56** (2005) P.357.
12）H. Schägger & G. von Jagow, Anal Biochem **199** (1991) P.223.
13）H. Schägger, in Membrane Protein Purification and Crystallization: A Practical Guide, ed C. Hunte, G. von Jagow, & H. Schägger (Academic Press, Amsterdam, 2002), P.105.
14）I. Wittig, H. P. Braun, & H. Schägger, Nat Protoc **1** (2006) P.418.
15）M. Herranen, N. Battchikova, P. Zhang, A. Graf, S. Sirpio, V. Paakkarinen, & E. M. Aro, Plant Physiol **134** (2004) P.470.
16）P. Zhang, N. Battchikova, T. Jansen, J. Appel, T. Ogawa, & E. M. Aro, Plant Cell **16** (2004) P.3326.
17）J. Komenda, V. Reisinger, B. C. Muller, M. Dobakova, B. Granvogl, & L. A. Eichacker, J Biol Chem **279** (2004) P.48620.
18）D. Huang, R. M. Everly, R. H. Cheng, J. B. Heymann, H. Schägger, V. Sled, T. Ohnishi, T. S. Baker, & W. A. Cramer, Biochemistry **33** (1994) P.4401.
19）Y. Ikeda, M. Komura, M. Watanabe, C. Minami, H. Koike, S. Itoh, Y. Kashino, & K. Satoh, Biochim Biophys Acta **1777** (2008) P.351.

# 6．タンパク質
## c．Native-Green PAGE

菓子野康浩[1)]

光化学系Ⅰ複合体や光化学系Ⅱ複合体などのクロロフィル結合タンパク質をクロロフィルを結合した状態で分離し，その生化学的性質を解析するための方法のひとつとして，電気泳動的に分離することが行われてきた．いわゆるNative-PAGEであるが，得られるバンドが緑色をしているため，Native-Green PAGEとも呼ばれる．本節では，いくつかのNative-Green PAGEについて，実験方法を簡単に紹介する．

## Native-Green PAGE

Yasuhiro Kashino

For the biochemical analysis of chlorophyll-binding proteins such as photosystem I and II complexes, native PAGE is one of the tool to separate those proteins.　The chlorophyll-binding proteins are colored in green on the gel.　In this section, outline of this electrophoresis system and the experimental procedure will be presented.

### 6.c.1　Native-Green PAGE

ポリアクリルアミドゲルなどを担体にした電気泳動は，タンパク質やタンパク質複合体を電荷や大きさによって分離する．その分離能は非常に高い．そのような電気泳動の中でも，タンパク質を変性させずに泳動し，タンパク質やタンパク質複合体を分離する電気泳動がNative PAGE（非変性電気泳動）である．Native PAGEによりタンパク質やタンパク質複合体を分離し，得られたタンパク質バンドの活性をゲル内で測定することや（活性染色），ゲルからタンパク質複合体などを抽出し，そのタンパク質組成，補因子の分析など生化学的な分析に用いられる．厚みのあるゲル等により，活性を保持したタンパク質やタンパク質複合体の精製に用いることも可能である．

光合成研究の分野でも，Native PAGEは盛んに行われてきた[1−3]．葉緑体やチラコイド膜を材料にしてこのようなNative PAGEを行うと，光化学系Ⅰ複合体，光化学系Ⅱ複合体，光捕集クロロフィル結合タンパク質（LHC），などのクロロフィル結合タンパク質がバンドとして分離される．そしてそのバンドが緑色を呈していることから，Native-Green PAGEとも呼ばれる．穏和な界面活性剤によりチラコイド膜を可溶化し，Native-Green PAGEを行って生理学的に完全な構成の光化学系Ⅰ複合体，光化学系Ⅱ複合体などを分離し，そのタンパク質組成を詳細に分析することも可能であろう．また一方，複合体を部分的に解体するほどの界面活性剤処理を行ってNative-Green PAGEを行うことで，サブユニット間の相互位置関係を解析する手段として用いることも可能であろう．タンパク質複合体の精製の場合と同様，Native-Green PAGEの際の可溶化およびゲルに用いる界面活性剤の種類や濃度，組み合わせにより，多様なアプリケーションが可能である．しかしこれは，界面活性剤の条件を適切に設定する必要があることも意味する．本稿では，近年用いられ始めたClear-Native PAGEや，古典的なDavisの系など，少数の例であるが実験方法を紹介する．また活性染色の例も最後の項で紹介する．

### 6.c.2　Clear-Native PAGE

これは，前節で概説したBlue-Native PAGEの変方である．Blue-Native　PAGE[4−6]では，陰極液（Cathode buffer）が濃い群青色をしており，泳動にともない陰極液中のCoomassie Blue G-250がゲル中に拡散していく．このために泳動中はバンドの認識が困難である場合が多い．ただし，泳動終了後にゲルを取り出すと，多量にあるクロロフィルタンパク質（複合体）は緑色のバンドとして認識できるので，Blue-Native　PAGEもNative-Green PAGEの一種ではある．Clear-Native PAGE[7,8]は，基本的にはBlue-Native PAGEにおける陰極液中のCoomassie Blue G-250を界面活性剤に置き換えたものである．これにより，泳動中もゲルは着色されず（clear），

1）兵庫県立大学大学院生命理学研究科

クロロフィルタンパク質は緑色のバンドとして分離される．バックグランドの濃い群青色がないため，クロロフィルタンパク質以外のタンパク質（複合体）の活性染色を行うことなども容易である．個人的な見解ではあるが，この系と界面活性剤との組み合わせを工夫することにより，多様なクロロフィル複合体および膜タンパク質複合体に応用でき，後に紹介する他の方法に取って代わることができるのではないかと考えられる．

[実験方法]

表1にClear-Native PAGEのためのストック溶液を示した．これは，6 b．Blue-Native PAGEに記した表1の陰極液に含まれるCoomassie Blue G-250を0.02%(w/v)n-dedecyl-β-D-maltoside(DDM)，0.05%(w/v)sodium deoxycholate(DOC)の組み合わせに置き換えたものである．泳動は，低温でBlue-Native PAGEと同様に行う．ただし，可溶化処理後の標品をそのままロードし，Blue-Native PAGEの際に必要であった陰極液の交換作業は必要ない．可溶化標品の比重が低い場合は，グリセロール等で比重を高くすると良い．Wittigら[7]は，上記の界面活性剤の組み合わせ以外に，0.05%(w/v)Triton X-100，0.05%(w/v)DOCの組み合わせ，0.01%(w/v)DDM，0.05%(w/v)DOCの組み合わせも紹介している．いずれの条件に於いても，陰イオン性界面活性剤DOCが含まれている．Wittigら[7]の報告等を参考にして，手元の標品を分離するのに適切な界面活性剤の組み合わせを検討すると良い．

必要に応じ，二次元目のSDS-PAGEを行う．一次元目のゲルからゲルストリップを切り出す際は，カッターナイフの刃を垂直に当て，押し切るようにすると切りやすい．

**表1**：Clear-Native PAGEのためのストック溶液

| ストック溶液 | 組成 |
|---|---|
| Cathode Buffer (pH 7.0) | 50 mM Tricine, 7.5 mM Imidazole 0.02%(w/v)DDM, 0.05%(w/v)DOC |
| Anode Buffer(pH 7.0) | 25 mM Imidazole-HCl |
| AB mix | 49.5%T, 3%C (48%(w/v)Acrylamide,1.5%(w/v) methylenebisacrylamide) |
| Gel Buffer(pH 7.0) | 75 mM Imidazole-HCl 1.5 M 6-Aminocaproic acid |

DDM，n-dodecyl-β-D-maltoside
DOC，sodium deoxycholate
未重合のアクリルアミドは高い神経毒性があるので，取り扱いには充分な注意が必要である．また，アクリルアミドを含む廃液は回収し，ゲル化させてから廃棄する．

## 6.c.3 Allenの系

Native PAGEとはいいながら，泳動時に一部のクロロフィルがタンパク質から遊離し，フリーのクロロフィルとして泳動先端に現れてしまう場合があった．しかし，穏和な非イオン性の界面活性剤が導入されるようになり，このような問題点が解決されていった．その例の一つがここで紹介するAllen & Staehelinによる系である[3]．この系では，従来の方法に比べて遊離色素を減らしてクロロフィル結合タンパク質（複合体）を分離することが可能となった．しかし，電極液に0.1%(w/v)SDSを用いているためか，光合成色素が若干遊離することは避けられないようである．複数の界面活性剤を組み合わせてチラコイド膜を可溶化した後，低温で電気泳動を行う．

[実験方法]

表2のようにストック溶液を調製し，表3にしたがってゲルを作製する．分離するクロロフィル結合タンパク質により，アクリルアミド濃度の調整が必要である．AllenとSteahelinによるオリジナルの報告[3]では，クラミドモナスを材料にして8%(w/v)アクリルアミドのゲルが使われている．予備実験により，濃縮ゲルが必要か

**表2**：Allenの系のためのストック溶液

| ストック溶液 | 組成 |
|---|---|
| X10 分離ゲル緩衝液 | 250 mM Tris, 500 mM Glycine (pH 8.3) |
| X10 濃縮ゲル緩衝液 | 250 mM Tris, 500 mM Glycine (pH 6.3) |
| 50%アクリルアミド溶液 | 49.5%(w/v)Acrylamide, 0.5%(w/v) methylenebisacrylamide |
| 電極液 | 25 mM Tris, 192 mM Glycine, 0.1%(w/v)SDS |

電極液は，Laemmliの系のものと同じ組成である．

**表3**：Allenの系におけるゲル液の調製（7%(w/v)アクリルアミド，ミニゲル）

| | 分離ゲル | 濃縮ゲル |
|---|---|---|
| X10 分離ゲル緩衝液 | 1 mL | − |
| X10 濃縮ゲル緩衝液 | − | 1 mL |
| 50%アクリルアミド溶液 | 1.4 mL | 0.6 mL |
| 純水 | 7.6 mL | 8.3 mL |
| (体積) | (10 mL) | (10 mL) |
| 10% APS | 50 μL | 100 μL |
| TEMED | 5 μL | 10 μL |

未重合のアクリルアミドは高い神経毒性があるので，取り扱いには充分な注意が必要である．また，アクリルアミドを含む廃液は回収し，ゲル化させてから廃棄する．

**表 4**：Davis の系のためのストック溶液

| ストック溶液 | 組成 |
|---|---|
| A（分離ゲル緩衝液） | 1.5 M Tris-HCl（pH 8.9），0.12% TEMED |
| B（濃縮ゲル緩衝液） | 494 mM Tris（pH 6.7），0.46% TEMED |
| C（28% アクリルアミド溶液） | 28%（w/v）Acrylamide，<br>0.735%（w/v）methylenebisacrylamide |
| D/2 | 10%（w/v）Acrylamide，<br>2.5%（w/v）methylenebisacrylamide |
| E（リボフラビン） | 0.004%（w/v）リボフラビン |
| F（40% スクロース） | 40%（w/v）スクロース |
| G（10% APS） | 10%（w/v）過硫酸アンモニウム |
| 電極液（pH 8.3）（x 10）<br>（pH を合わせる必要はない） | 50 mM Tris，384 mM Glycine |

否かを検討する．また，予備実験により，チラコイド膜の可溶化のための界面活性剤の種類，濃度を比較検討する．0.5 mg Chl/mL（0.05% w/v）の濃度のチラコイド膜に対して，界面活性剤の影響を検討するものである．Allen と Steahelin による報告[3]では，0.45%（w/v）n-octyl-$\beta$-D-glucoside（OG），0.45%（w/v）DDM，0.1%（w/v）LDS（Chl: OG: DDM: LDS＝1：9：9：2）の条件で氷上で 30 分間の処理が行われている．Chl: OG: DDM: LDS＝1：18：18：1 や Chl: OG: DDM: LDS＝1：20：20：4，などの条件で可溶化を行い，実際に泳動を行って濃度条件や界面活性剤の種類を検討する．我々は，*Synechocystis* sp. PCC 6803 のチラコイド膜を Chl: OG: DDM: LDS＝1：10：10：1，キュウリのチラコイド膜を Chl: OG: DDM: LDS＝1：20：20：2，で処理し，2 mA で約 2 時間の泳動（ミニゲル）を行うことにより，クロロフィル結合タンパク質を分離することができた．

必要に応じ，二次元目の SDS-PAGE を行う．

## 6.c.4 Davis の系[9]

古くから用いられてきた系である．現在でも，より穏和な界面活性剤で可溶化処理を行い，クロロフィル結合タンパク質を分離する目的に用いられている[10,11]．表 4 のストック溶液を調製し，表 5 にしたがってゲルを作製する．界面活性剤の種類や濃度は，用途に応じて検討を行う．Yamazaki ら[10]，Chen ら[11]は，DDM を用いて泳動を行っている．分離ゲル液を脱気し，過硫酸アンモニウム（APS）を加え，静かに撹拌してからゲル板に注ぎ込む．純水を静かに重層し，ゲル化するまで静置する．分離ゲルがゲル化したら，重層した純水を排出し，濃縮ゲル液に E（リボフラビン溶液）を加える．濃縮ゲルの上面を共洗いし，濃縮ゲル液を加えてコームを差し，蛍光灯の光により光重合を行う．濃縮ゲル液の黄色い色が消えて白くなると，ゲル化が完了している．

チラコイド膜を界面活性剤により可溶化し，遠心して可溶化上清を得，低温で電気泳動を行う．必要に応じ，二次元目の SDS-PAGE を行う．

*Thermosynechococcus elongatus* チラコイド膜（1 mg Chl/mL，50 mM Tris（pH 7.5），10 mM NaCl）を 0.8% OG で処理し（室温，30 分），遠心後の上清を上記のジギトニンを含む Davis の系で泳動を行うことにより，光化学系 II コア複合体を得ることができる．このゲル条件では，10 mA，30 分程度の泳動により，ゲル上部から光化学系 I 複合体（濃い緑色），光化学系 II コア複合体（やや薄い緑色），カロチノイド（黄色），フィコビリゾーム（青色）の順でバンドが得られる．

## 6.c.5 デオキシコール酸を含む系

我々の研究室では，ラン色細菌のチラコイド膜を泳動し，ジアフォラーゼ活性による活性染色にも用いてい

**表 5**：Davis の系におけるゲル液の調製（スラブゲル）
（5%（w/v）アクリルアミド，0.2%ジギトニン）

| | 分離ゲル | 濃縮ゲル |
|---|---|---|
| A（分離ゲル緩衝液） | 5.25 mL | − |
| B（濃縮ゲル緩衝液） | − | 0.6 mL |
| C（28%アクリルアミド溶液） | 3.75 mL | − |
| D/2 | − | 1.2 mL |
| E（リボフラビン）* | − | 0.6* |
| F（40%　スクロース） | − | 2.4 |
| 純水 | 12 mL | 8.3 mL |
| ジギトニン | 42 mg | 9.6 mg |
| （体積） | （21 mL） | （4.8 mL） |
| 10%　APS | 150 $\mu$L | − |

*E（リボフラビン）は，濃縮ゲルを作製する直前に加える．
未重合のアクリルアミドは高い神経毒性があるので，取り扱いには充分な注意が必要である．また，アクリルアミドを含む廃液は回収し，ゲル化させてから廃棄する．

**表 6**：デオキシコール酸を含む系のためのストック溶液

| ストック溶液 | 組成 |
|---|---|
| AB Mix | 49.5%T, 3%C<br>(48% (w/v) Acrylamide,<br>1.5% (w/v) methylenebisacrylamide) |
| x10 ゲル緩衝液 | 0.25 M Tris, 1.9 M Glycine |
| 60%Sucrose | 60% (w/v) Sucrose |
| 5 %DOC | 5% (w/v) NaDOC |
| 陰極液（Cathode buffer） | 25 mM Tris, 0.192 M Glycine, 0.1% (w/v) NaDOC |
| 陽極液（Anode buffer） | 25 mM Tris, 0.192 M Glycine |

**表 7**：デオキシコール酸を含む系におけるゲル液の調製（スラブゲル）
(5-18% (w/v) アクリルアミド，0.1%デオキシコール酸)

| | アクリルアミド溶液 | | |
|---|---|---|---|
| | 5 %T | 18%T | Stacking (4%T) |
| AB Mix | 1.0 mL | 3.67 mL | 0.5 mL |
| x10 ゲル緩衝液 | 1.0 mL | 1.0 mL | 0.6 mL |
| 60%Sucrose | − | 3.0 mL | − |
| 5 %DOC | 0.2 mL | 0.2 mL | 0.12 mL |
| 純水 | 7.75 mL | 2.1 mL | 4.73 mL |
| (体積) | (10 mL) | (10 mL) | ( 6 mL) |
| 10%過硫酸アンモニウム | 50 μL | 30 μL | 50 μL |
| TEMED | 5.0 μL | 3.0 μL | 5.0 μL |

る[12]．表 6 のストック溶液を調製し，表 7 にしたがってゲルを作製する．*Synechocystis* sp. PCC 6803 のチラコイド膜 (25% glycerol，10 mM $CaCl_2$，10 mM $MgCl_2$，50 mM MES(pH 6.5)) を 0.5 mg Chl/mL，1% DDM で 30 分間，氷上にて可溶化処理する．遠心後，可溶化上清 (1 レーン当たり 10 μg Chl 相当量) を上記ゲルにロードし，4 ℃にて泳動を行う．電圧は，当初 100 V を印加し，段階的に 400 V まで上げていく．必要に応じ，二次元目の SDS-PAGE を行う．

ジアフォラーゼ活性による活性染色を行う場合，泳動終了後のゲルを染色緩衝液 (50 mM Tris-HCl(pH 7.5)，0.25 mM EDTA，and 0.1 mg/mL nitroblue tetrazolium chloride (NBT)) 中で 30 分程度振とうし，0.2 mM NADH または 0.2 mM NADPH を添加する．青い色が充分に発色するまで振とうし，その後純水に置き換える．

## 参考文献


1) J. M. Anderson, Biochim Biophys Acta **591** (1980) P. 113.
2) A. Yamagishi & S. Katoh, Arch Biochem Biophys **225** (1983) P.836.
3) K. D. Allen & L. A. Staehelin, Anal Biochem **194** (1991) P.214.
4) H. Schägger & G. von Jagow, Anal Biochem **199** (1991) P.223.
5) H. Schägger, in Membrane Protein Purification and Crystallization: A Practical Guide, ed C. Hunte, G. von Jagow, & H. Schägger (Academic Press, Amsterdam, 2002), P.105.
6) I. Wittig, H. P. Braun, & H. Schägger, Nat Protoc **1** (2006) P.418.
7) I. Wittig, M. Karas, & H. Schägger, Mol Cell Proteomics **6** (2007) P.1215.
8) I. Wittig, R. Carrozzo, F. M. Santorelli, & H. Schägger, Electrophoresis **28** (2007) P.3811.
9) B. J. Davis, Ann N Y Acad Sci **121** (1964) P.404.
10) J. Y. Yamazaki, A. Kozu, & Y. Fukunaga, Photosynth Res **89** (2006) P.19.
11) G. Chen, X. Niu, X. Chen, L. Li, T. Kuang, & S. Li, Photosynth Res **96** (2008) P.75.
12) J. Ooyabu, M. Ohtsuka, Y. Kashino, H. Koike, & K. Satoh, Biosci Biotech Biochem **72** (2008) P.3180.

# 6．タンパク質
## d-1．二次元電気泳動

岩井　優和[1)]，皆川　　純[1)]

光合成反応は多数のタンパク質によって支えられている．それらを網羅的に解析する際，一次元 SDS-PAGE では全てのタンパク質を分離することは困難であるため二次元電気泳動が行われる．本項では，一次元目に等電点電気泳動，二次元目に SDS-PAGE を用いた二次元電気泳動のプロトコルを紹介する．

## Two-dimensional electrophoresis

Masakazu Iwai, Jun Minagawa

Two-dimensional electrophoresis (2DE) based on two different principles has been employed to separate many proteins. In this chapter, we describe a protocol for 2DE with isoelectric focusing (IEF) and SDS-PAGE of solubilized thylakoid membranes of *C. reinhardtii*.

### 6.d-1.1　背景

通常の一次元 SDS-PAGE ではバンドが重なり分離されないタンパク質も，二次元電気泳動（2DE）を行うことで分離できる可能性が高まる．一次元目の電気泳動に等電点電気泳動（IEF），二次元目の電気泳動に SDS-PAGE が使われることが多い．光合成研究では BN-PAGE を一次元目に行う方法も見られる．注意する点は，異なる機会に得られた二枚の 2DE ゲルのタンパク質の量を比べることが難しい点である．また，一次元目にのせるタンパク質の量には限界があり，分離されたとしても少量のタンパク質であると CBB 染色では染まらないことが多い．そのためしばしば銀染色が行われるが，銀染色は定量性に乏しく，同一ゲル上であってもタンパク質の量を比べることはできない（この点を改善した染色法として Flamingo 染色が知られる．）このため，2DE は定性的な解析手段として用いられることが多い．最近，異なるタンパク質サンプル（例えば，ストレス前と後）を異なる蛍光染色でラベルし，それを混合し一枚の 2-DE ゲルで展開する方法も行われるようになった（2D-DIGE）．本稿では，緑藻クラミドモナスのチラコイド膜を 2DE で展開し，質量分析で LHC タンパク質の同定を行った例を示す．一次元目は等電点電気泳動，二次元目は SDS-PAGE を行う．疎水性の高い PS2 のコアタンパク質は Immobiline DryStrip に浸透しないなど，必ずしも目的タンパク質が展開されるとは限らない点に注意が必要である．PS2 コアタンパク質を IEF で分離する方法は Kashino et al.（2007）[1)] を参照されたい．

1）北海道大学低温科学研究所

### 6.d-1.2　プロトコル（Hippler *et al.*, 2001[2)] を改変）

#### 6.d-1.2.1　試薬

可溶化バッファー

| | |
|---|---|
| 2 M thiourea | 1.5 g/10 mL |
| 8 M urea | 4.8 g/10 mL |
| 4%（w/v）CHAPS | 0.4 g/10 mL |
| 20 mM Tris-base | 24.2 mg/10mL |
| 30 mM DTT | 46.2 mg/10mL |
| 0.5%（v/v）IPG buffer（GE Healthcare） | 50 μL/10 mL（pH の幅に注意） |
| 0.05% β-DM | 25 μL of 20% DM/10 mL |
| Orange G 微量/10 mL | |

平衡化溶液A
（※ Immobiline DryStrip 1 本につき 5 mL 必要）
50 mM Tris（pH 6.8/HCl）
6 M urea
30%（v/v）glycerol
2%（w/v）SDS
2%（w/v）DTT

平衡化溶液B
（※ Immobiline DryStrip 1 本につき 5 mL 必要）
50 mM Tris（pH 6.8/HCl）
6 M urea

30%(v/v)glycerol
2%(w/v)SDS
2.5%(w/v)iodoacetamide
bromphenol blue　微量

### 6.d-1.2.2　装置など

- Multiphor II（GE Healthcare）
- Immobiline DryStrip（適した pH range を選択）
- IPG Buffer（適した pH range を選択）
- Immobiline DryStrip 膨潤トレー
- Immobiline DryStrip アライナー
- 等電点泳動トレー
- 等電点電極（陰極・陽極）
- 等電点用電極ろ紙（5 x 20 mm）
- シリコンオイル
- SDS-PAGE 用スラブ
- 2DE 用コーム（下図）

**1日目**（Immobiline DryStrip の膨潤）

1．タンパク質サンプル中のポリペプチドをクロロフォルム・メタノール法[3]により沈殿させる．これにより色素を除き，その電荷が等電点電気泳動に影響するのを防ぐことができる．
2．Immobiline DryStrip(11 mm)一本につき，0～100 $\mu$g protein のポリペプチドサンプルを 230 $\mu$L の可溶化バッファーで可溶化するため，室温で 1 時間インキュベートする．
3．可溶化サンプルを 9,000 $g$ 5 分間遠心する．
4．200 $\mu$L の上清を分取し，IPG buffer を 1 $\mu$L 加える．※加えるバッファーの pH 幅に注意．
5．上記サンプル溶液 200 $\mu$L を膨潤トレーの溝に添加する．

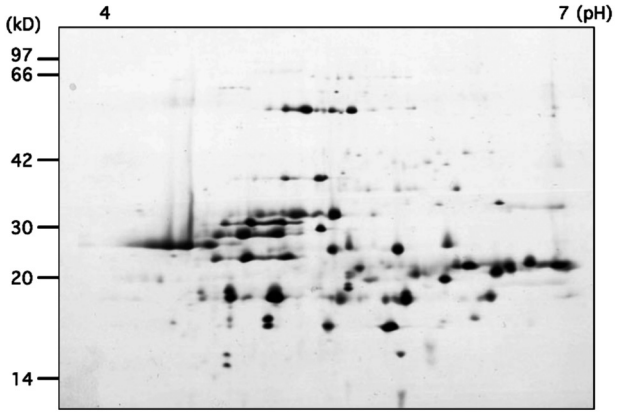



**図1**：クラミドモナス葉緑体タンパク質の 2 次元電気泳動（IEF を一次元目（横方向，SDS-PAGE を二次元目（縦方向）に行った．

6．Immobiline DryStrip のゲル面を下にして，サンプル溶液が入ったトレーの溝にゆっくりと置く．Strip のゲルが溶液に完全に浸たるように注意する．
7．サンプル溶液の蒸発と urea の結晶化を防ぐため Strip の上を 2～3 mL のシリコンオイルで覆う．
8．トレーの蓋をし，12 時間室温で放置する．

**2日目**（一次元目の電気泳動：等電点電気泳動）

1．Multiphor II の冷却プレートを 15°Cに設定．
2．冷却プレートの上に 2～3 mL のシリコンオイルをのせ，等電点泳動トレーをその上に置く．プレートとトレーの間に空気が入らないように注意する．
3．12～15 mL のシリコンオイルをトレーの上にのせ，Immobiline DryStrip アライナーをトレーの上に置く．トレーとアライナーの間に空気が入らないように注意する．
4．膨潤済みの Strip をアライナーの溝に置く．ゲル面は上．Strip の＋側と－側に注意する．
5．等電点用電極ろ紙を水で適度に湿らせる．
6．湿らせたろ紙を Immobiline DryStrip の両端の上に置く（ゲルの両端から 3 mm 幅分を重ねれば充分）
7．陽極線と陰極線を湿らせたろ紙の上にセットする．
8．120～150 mL のシリコンオイルをトレーに静かに注ぐ．
9．トレーの電極を Multiphor II の泳動槽に接続し，Multiphor II のフタを閉める．
10．300 V/1 mA/5W で一時間泳動後，1400 V/1 mA/5W で 19 時間泳動を行う（合計 20600 Vh）．等電点電気泳動の場合，泳動時間の超過はさほど問題にならない．最初の一時間泳動後，Orange G が流れているのを確認する．

**3日目**（二次元目の電気泳動：SDS-PAGE）

1．一次元目終了後，Immobiline DryStrip を取り出し，フィルム側についているシリコンオイルを拭っておく．
2．取り出した Immobiline DryStrip は試験管などに入れる．二次元目を当日にやらない場合は，－80°Cで保存する．
3．試験管に平衡化溶液Ａを加え，15 分間インキュベートする．
4．Strip を取り出し，ゲルに触れないようにフィルム側の平衡溶液Ａをキムワイプなどで吸い取る．
5．平衡化溶液Ｂが入った試験管に Strip を入れ，10 分間インキュベートする．

6．2DE 用コームを使って，ゲルを作っておく
7．スタッキングゲルの上に Strip を挟み込む．
8．通常通りに電気泳動を行う．この時，マーカーや一次元目の等電点電気泳動で使用したサンプルを横に同時に流しておくと良い指標となる．

## 参考文献


1）Y. Kashino, Y., T. Harayama, H. B. Pakrasi, K. Satoh, J. Chromatogr. B **849** (2007) P.282.
2）M. Hippler, J. Klein, A. Fink, T. Allinger, P. Hoerth, Plant J. **28** (2001) P.595.
3）D. Wessel, U. I. Flügge, Anal. Biochem. **138** (1984) P. 141.

# 6．タンパク質
## d-2．ショ糖密度勾配超遠心法

岩井　優和[1)]，皆川　　純[1)]

光合成反応は，光化学系Ⅰ，光化学系Ⅱを始め，いくつものタンパク質複合体，あるいはタンパク質超複合体によって行われる．「ショ糖密度勾配超遠心法」は，これらの複合体を大きさによって分画する場合に広く用いられている．本項では，緑藻クラミドモナスの葉緑体上の光化学系複合体を例に取り，ショ糖密度勾配超遠心法のプロトコルを紹介する．

## Sucrose density gradient ultracentrifugation

Masakazu Iwai, Jun Minagawa

Sucrose density grandient ultracentrifugation has been widely used to separate pigment-binding protein (super) complexes on the photosynthetic membranes. In this chapter, we describe a standard protocol for sucrose density gradient ultracentrifugation of the *C. reinhardtii* thylakoid membrane proteins.

### 6.d-2.1　背景

密度勾配を形成したショ糖溶液上に混合物からなるサンプルを重層し超遠心を行うことで，様々なタンパク質・タンパク質複合体粒子，さらにはさまざまなオルガネラを分画することができる．粒子の沈降速度は沈降係数（粒子の比重，形，質量などによって決定される）に依存するのに対し，平衡に達した地点での沈降距離は粒子の比重に依存する．そのため，光化学系タンパク質複合体やLHCタンパク質など比較的近い比重を持つ粒子を分子量の違いによって分離するには，平衡に達するまでの間の沈降速度の違いを利用してバンドを形成させる(rate zonal centrifugation)．一方，オルガネラを分画する場合は，平衡に達するまで遠心し，密度の違いを利用してバンドを形成させる(isopycnic centrifugation)．この方法で得られたタンパク質複合体試料は比較的無傷に保たれるため，ゲルろ過などの各種クロマトグラフィーや結晶化に用いるのに適している．ショ糖以外にはグリセロールの密度勾配を用いる場合があり，例えばPSIIコアのdimerとmonomerを分離することができる[1)]．

### 6.d-2.2　プロトコル

ここでは日立超遠心スイングローターP40STと専用遠沈管13PAチューブ(13 mL)を使用した場合を例に取り解説する．グラジエントは市販のグラジエントメーカーを使うのが一般的だが，以下に示すステップグラジエントを用いる方法は，より簡便で多くの場合良好な結果が得られる．扱うサンプルによってバッファー組成は異なるが，ここではチラコイド膜からLHCII，光化学系1超複合体，光化学系2複合体を分離する方法を示す．

1．1.3 M，1.0 M，0.7 M，0.4 M，0.1 Mのショ糖を含むバッファー（25 mM MES，pH 6.5/NaOH）を各2.2 mLずつ，遠沈管の数だけ用意する．
2．界面活性剤（$\beta$-DM）を終濃度0.05%になるように各バッファーに添加する．
3．まず，2.1 mLの1.3 Mバッファーを遠沈管に入れる．この時，ピペッティングで，空気の泡を水面につくる．その泡がクッションの役目となり，次の1.0 Mバッファーの重層が容易になる．
4．同様に，1.0 M，0.7 M，0.4 M，0.1 Mの順にバッファーをゆっくりと重層する．(このようにして作成したステップグラディエントは，超遠心後はリニアグラディエントとなる．）完成したショ糖密度勾配溶液は4℃で保存する．
5．精製したチラコイド膜を25 mM MES，pH 6.5/NaOH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．
6．チラコイド膜懸濁液に$\beta$-DM（終濃度0.8%）を加え，撹拌しながら4℃で10分間可溶化する．
7．可溶化したチラコイド膜（0.3〜0.5 mL）を4．で作成したショ糖密度勾配に重層し，超遠心(100,000 $g$，24時間）を行う．

1）北海道大学低温科学研究所

8．超遠心後，遠沈管の底にシリンジで穴を開け，溶液をチューブや 96 穴プレートに分画する．少数のバンドのみを回収する場合は，上からシリンジなどで吸い出してもよい．通常，上から LHCII（A 1 バンド），PSII コア粒子（A 2 バンド），PSI-LHCI 超複合体（A 3 バンド）の緑色の 3 本のバンドが得られる（図 1）．

## 参考文献


1）I. Sakurai, J.-R. Shen, J. Leng, S. Ohashi, M. Kobayashi, H. Wada, J. Biochem. **140** (2006) P.201.

2）H. Takahashi, M. Iwai, Y. Takahashi, & J. Minagawa, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **103** (2006) P.477.

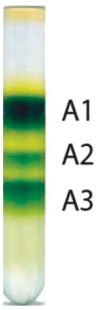




**図 1**：クラミドモナスより単離したチラコイド膜を可溶化し，ショ糖密度勾配超遠心により 3 つの複合体に分離した（Ref. 2 を改変）．

# 6．タンパク質
## e．タンパク質の質量分析

小澤真一郎[1)]，井上(菓子野)名津子[1)]，高橋裕一郎[1)]

光合成生物のゲノム解析の進展と質量分析計の進歩により，微量の光合成タンパク質の解析が容易になった．本章では，二次元電気泳動法で分離したタンパク質を質量分析計で同定する方法について紹介する．

## Characterization of photosynthetic proteins by mass spectrometry

Shin-ichiro Ozawa, Natsuko Inoue-Kashino, Yuichiro Takahashi,

Combination of genomic information of photosynthetic organisms and mass spectrometric analyses enables one to identify a large number of proteins and polypeptides separated by one- or two-dimentional SDS-PAGE. In this chapter, we introduce principles and methods of mass spectrometric analyses of proteins.

### 6.e.1　質量分析の原理

質量分析計は，ポリペプチドをイオン化し，質量対電荷比（mass-to-charge ratio, $m/z$）を実測する．イオン化手法として，MALDI（Matrix-assisted laser desorption/ionization）と ESI（Electrospray ionization）が一般的に用いられる．ESI の中でも，感度を上げるためにスプレーを微少にしたものを NSI（Nano-spray ionization）という．正電荷のイオン化を促進するため，ギ酸や TFA（トリフルオロ酢酸）を溶液に加える．MALDI ではまずマトリックスとサンプルとで結晶を作る．そこにパルスレーザーを照射することで，マトリックスが速やかに昇華しペプチドにエネルギーが伝達され，イオン化する．ESI（NSI）ではペプチドを含んだ溶液を霧状に放出させ，高電場下で溶液を蒸発させ，正電荷にイオン化されたペプチドを得る．

イオン化した物質の分析法には，加速器内の一定距離を飛行する時間を測定する TOF（Time of flight，飛行時間）法や，磁場中における荷電粒子の挙動を利用するイオントラップ（Ion trap）法，四重極（Quadropole）法が利用される．一般に，イオントラップや四重極法は精度で TOF 法に劣るが，データの S/N が高い．市販されている製品は MALDI でイオン化し TOF で分析する MALDI-TOF/MS や，NSI でイオン化しイオントラップと四重極で分析するハイブリッド型 NSI-MS などがある．MALDI-TOF/MS は単独で使用する例が多いが，NSI-MS は数十nl/min で送液することができるナノ液体クロマトグラフィー（nano LC, nano Liquid chromatography）と組み合わせ，LC-MS として使用することが多い．

イオントラップ型質量分析計では，質量分析装置内でペプチドを開裂させ，アミノ酸配列の情報を得ることができる．ペプチドイオンをイオントラップ部に導き，ヘリウムなどの化学的に安定なガス中で振動エネルギーを加え互いに衝突させペプチドイオンを開裂させる（CID, Collision Induced Dissociation）．ポリペプチド結合を開裂するようにエネルギーを調節して，N 末端側の b イオンと C 末端側の y イオンを得る（図 1）．開裂前のイオンを前駆体イオン（Precursor ion），開裂の結果生じたイオンをプロダクトイオン（Product ion）という．図 1 を例にとると，一度の開裂，すなわち MS/MS，により b イオンと y イオンがそれぞれ 3 種類（ペプチド結合の数と一致する），合計 6 種類のプロダクトイオンが生じる．この一連の測定によって得られた前駆体イオンとプロダクトイオンの質量のデータ一揃いと，データベースに登録されているタンパク質をトリプシンで消化したペプチド（前駆体イオンに相当する）とそこから生じると予測されるプロダクトイオンの質量のデータ一揃い，を比較することによってポリペプチドを同定する．MS/MS では前駆体イオンとプロダクトイオンの情報を組み合わせてアミノ酸配列情報を得るので，少ないタンパク質の消化断片からでも高い信頼性でタンパク質を同定できる．また，タンパク質の同定だけではなく化学架橋剤を利用した架橋部位の特定[1)]にも用いられる．

特別に高性能な質量分析計は別として，タンパク質の同定には既存のデータベースを参照するので，正確で信

1）岡山大学大学院自然科学研究科

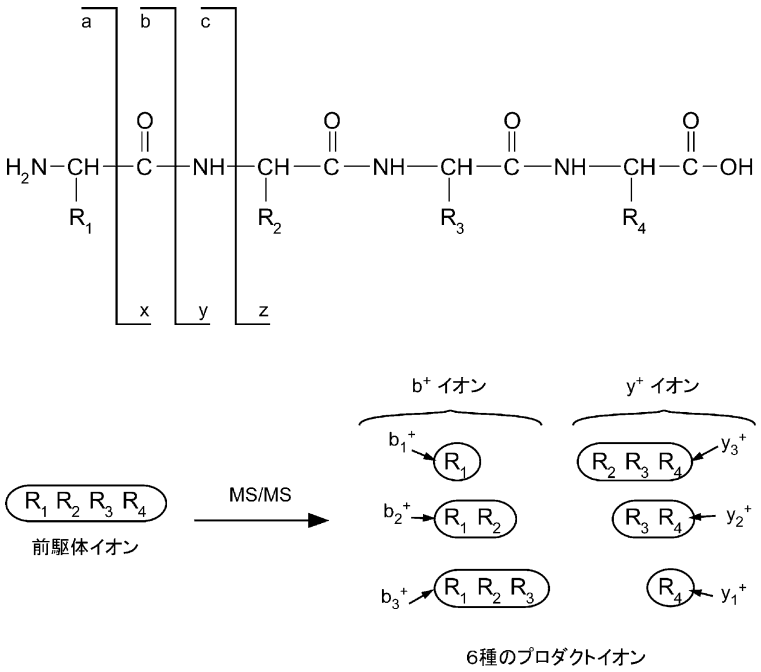



**図1**：MS/MS によるアミノ酸配列の同定．
質量分析装置内でポリペプチド結合を開裂させ，前駆体イオンからプロダクトイオン（b イオンと y イオン）を得る．ここに示すように，4 残基を含むポリペプチド（$R_1R_2R_3R_4$）からは 6 種類のプロダクトイオン（$b_1^+, b_2^+, b_3^+, y_1^+, y_2^+, y_3^+$）が生成される．

頼性の高いタンパク質データベースが必要不可欠である．

## 6.e.2 二次元電気泳動で分離したタンパク質の質量分析

質量分析計は感度が高いので，タンパク質を精度よく同定するには，可能な限り精製して混合物を除いておくと良い．特に網羅的な解析には，多種類のタンパク質を高分解能で分離することができる二次元電気泳動法が良く用いられる[2,3]．ここでは等電点電気泳動後に二次元目の SDS-PAGE を行いスポットとして分離したタンパク質を質量分析で同定する手法を紹介する．

等電点電気泳動法とは，両性担体（キャリアアンフォライト）を含む泳動ゲルに高電圧をかけて pH 勾配を形成し，タンパク質の等電点（pI）によって分離する手法である[4]．等電点電気泳動による膜タンパク質の分離は一般に難しいとされているが[5]，変性剤濃度や緩衝液系の最適化やゲルの支持体にアガロースを使用するなど様々な工夫がされている[6–9]．等電点電気泳動は，現在ではプレキャストのゲルストリップ（Immobilized pH gradient gel strip；IPG，GE Healthcare や Bio-Rad）を使うのが一般的である．さまざまな pI 値のタンパク質を分離するには pH 範囲の広い（pH 3–11）ものを，pI 値の近いタンパク同士を分離するには pH 範囲の狭いものを，それぞれ選択する．

二次元目の SDS-PAGE の後，分離されたタンパク質を染色し，スポットを切りだしてトリプシンなどのタンパク質分解酵素によりゲル内消化を行う．得られたペプチドの質量を質量分析計で求め，ゲノム情報と照合しタンパク質を同定する．表 1 にまとめたタンパク質検出法のうち，感度の高さ，脱色のしやすさ，そして肉眼でスポットを確認できる簡便さから銀染色がよく用いられる．

## 6.e.3 脂質除去処理[10]

チラコイド膜など脂質を多く含むサンプルを等電点電気泳動にかける場合は，脂質除去[10] を行う．水飽和クロロフォルムは，クロロフォルムと水をマイクロチューブに取り，ボルテックスした後静置して，下層に分離して使う．

1．サンプル 100 μl にメタノールを 400 μl 加えボルテックス後，21,500 g で 10 秒間遠心し上清を回収する．
2．1 で回収した上清に水飽和クロロフォルムを 100 μl 加えボルテックスし，21,500 g で 10 秒間遠心後，上清を回収する．

**表1**：質量分析で使われるタンパク質検出法

| 検出法 | 感度 | 定量性 | 検出までに要する時間 | 検出装置 |
|---|---|---|---|---|
| CBB 染色 | △ | ○ | 2時間程度 | 必要なし |
| 銀染色 | ◎ | × | 2時間程度 | 必要なし |
| 蛍光色素染色 | ○ | ◎ | 5時間程度 | 蛍光スキャナー |
| CyDye | ○ | ◎ | 泳動直後 | 蛍光スキャナー |

CBB 染色は感度が劣るが手軽に検出できる．しかし，質量分析前の脱色に時間がかかる欠点がある．蛍光色素染色は感度と定量性に優れ，質量分析サンプル調整前の脱色が不要だが，検出に蛍光スキャナーが必要である．CyDye は泳動前にタンパク質を蛍光色素でラベルするので泳動終了後直ちに検出できるが，まだ一般的ではない．銀染色は定量性に劣るものの，比較的短時間に十分な感度でタンパク質を検出できる．蛍光色素染色後の二重染色も可能であり，分析前の脱色も容易なので質量分析では最もよく使われる．

3．水を 200 μl 加えボルテックスし，21,500 g で 1 分間遠心する．
4．この遠心により二層に分配された液層の中間に分離されるタンパク質を吸わないように上の相（水相）を除去する．そして下の相（有機相）にメタノールを 300 μl 加えボルテックスし，21,500 g で 2 分間遠心する．
5．上清を除去し，沈殿に 95%(v/v) メタノールを 500 μl 加えボルテックスし，21,500 g で 2 分間遠心する．
6．ステップ 5 をもう一度行い，沈殿を遠心濃縮機で乾燥させる．
7．11 cm 長 IPG ゲルストリップを使う場合は 120 μl の水で懸濁し，次に示す膨潤液を調製する．

## 6.e.4 Immobilized pH gradient gel strip(IPG)を用いた等電点電気泳動

ここでは 11 cm 長 IPG ゲルストリップの場合を紹介する．

1．膨潤液｛サンプル 120 μl に，以下の試薬を加え，水で 200 μl に合わせる．尿素 0.096 g(8 M)，チオ尿素 0.031 g(2 M)，10%(w/v)DDM 20 μl(1%(w/v)，イソプロパノール 30 μl(15%(v/v))，1 M DTT 5 μl(25 mM)，IPG buffer 4 μl(2%(v/v))，0.1%(w/v) Orange G 4 μl(0.002%(w/v))｝をゲルストリップにかぶせ，専用のミネラルオイルで封入する．
2．20°C，50 μA/ストリップ，10 時間で膨潤させる．
3．等電点電気泳動を行う．15 分間 300 V，30 分間 500 V，60 分間 1000 V，7 時間 3000 V，7 時間 8000 V，の順に，段階的に電圧を上げ，泳動終了後は 300 V を維持する．

## 6.e.5 アガロースゲルを用いた等電点電気泳動[9)]

泳動ゲルにポリアクリルアミドを使う IPG ゲルストリップでは，疎水性タンパク質の分離は芳しくない．しかし，ポリアクリルアミドよりも大きな分子櫛を持つアガロースを使うことで，疎水性タンパク質をきれいに分離できる等電点電気泳動法が最近開発された[9)]．ディスク泳動用のキャピラリー管にゲルを作成し，ディスク泳動装置で泳動する．アガロースは等電点電気泳動用を使い，ゲル化と泳動は 4°C で行う．

1．ディスク泳動用のキャピラリー管からアガロースゲルを取り出しやすくするため，1 ml サイズのピペットバルブをキャピラリー管の一端に取り付け，シグマコート（Sigma）の吸引･吐出を数回繰り返し，その後立てかけて乾燥させ，内壁をコーティングする．
2．2 cm 角の透析膜（dialysis membrane, size 27(cut-off size～14,000)，和光）を水で数回洗い，キャピラリー管の一端に透析膜を密着させ，短いゴム管で固定しパラフィルムを巻く．キャピラリー管先端に取り付けた透析膜は，泳動中も外さない．
3．サンプルとゲル溶液を混ぜてゲルを作成する．サンプルを後からロードする場合は，キャピラリー管上部に 5 mm ほど残してゲルを作成し，手順 6 で管をセットしてからサンプルをロードする．2.5 mm x 7 mm x 130 mm（内径 x 外径 x 長さ）のキャピラリー管 4 本分の場合，20 ml の三角フラスコに，ソルビトール 0.48 g，等電点電気泳動用アガロース 0.04 g，純水 2 ml を入れ電子レンジでアガロースを完全に溶解させる．手早く尿素 1.2 g とチオ尿素 0.6 g を加え，撹拌する．室温まで温度が下がったら撹拌しながら，20%(w/v) DDM を 200 μl，Pharmalyte（キャリアアンフォライト）を 400 μl，1 M DTT を 8 μl，サンプルを 20 μl，の順に加える．｛0.66 M ソルビトール，1% DDM，5 M

尿素，2 M チオ尿素，2 mM DTT，10% Pharmalyte，1% アガロース}．

4．1 mL シリンジの先端にキャピラリー管よりも細いテフロンチューブを取り付け，チューブ先端をキャピラリー管の一番奥まで差し込んで，液面の上昇に合わせてチューブ先端を引き上げながら気泡ができないようにゲル液を注ぎ込む．

5．4 ℃で 15 時間以上かけてゲル化させる．

6．下部泳動槽に陽極液{680 μl リン酸(85%)/1000 ml}を入れ，キャピラリー管をセットする．

7．泳動槽上部に陰極液｛0.2 M NaOH｝を入れる．

8．50 V で 30 分間，100 V で 30 分間，300 V で約 24 時間，4 ℃で泳動する．

9．ゲルの温度を十分に下げるため，泳動終了 30 分前に電圧を 50 V に下げる．

## 6.e.6 SDS-PAGE

二次元目の SDS-PAGE は，6 a 章に述べられた方法を用いる．分析するタンパク質の性質（サイズ，膜タンパク質であるか水溶性タンパク質であるかなど）により電気泳動システムを選択する．一次元目の電気泳動で分離したタンパク質に SDS と SH 基還元剤を加えて変性させる．この時，メルカプトエタノールを還元剤として用いると，システイン残基が不可逆的な架橋産物（分子質量が 75.998 Da 増加する）を形成するので，SDS-PAGE の還元剤には DTT を使う．

等電点電気泳動を一次元目に行った場合，二次元目の SDS-PAGE の濃縮ゲルは特殊形状のコームを使って作成すると良い（図 2）．端のウェルに分子量マーカータンパク質を泳動すれば，分離されたタンパク質スポットの分子質量を求めることができる．

等電点電気泳動に IPG ゲルストリップを用いた場合の二次元目の電気泳動．

1．ゲルストリップを取り出す．

2．2.5 ml の平衡化液 A｛50 mM Tris-HCl pH 8.8 (25℃)(1 M ストックより調製)，6 M 尿素，30%(w/v) glycerol，1%(w/v) SDS (20% ストックより調製)，16 μM DTT（1 M ストックより調製），0.00044% (w/v) BPB (1% ストックより調製)｝にゲルストリップを 15 分間漬け平衡化する．

3．2.5 ml の平衡化液 B｛50 mM Tris-HCl pH 8.8 (25℃)(1 M ストックより調製)，6 M 尿素，30%(w/v) glycerol，1%(w/v) SDS (20% ストックより調製)，4.5%(w/v) Iodoacetamid（使用直前に調製する），

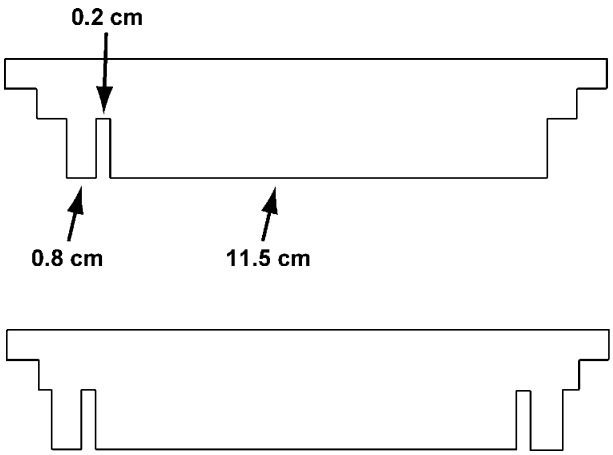



図 2：二次元電気泳動ゲルのコーム
二次元電気泳動では，一次元目の IPG ゲルを載せるために特殊形状のコームを利用すると便利である．一次元目のゲルを載せたときに二次元目のゲルとの間に隙間が生じないように，ウェルの深さをゲルの幅に合わせるように濃縮ゲルを作成する．

0.00044%(w/v) BPB（1% ストックより調製)）にゲルストリップを 15 分間漬け，平衡化する．平衡化中に 0.5%(w/v)アガロースゲル溶液(核酸泳動用．溶媒は水.）を準備する．

4．ゲルストリップを二次元目の濃縮ゲルとの間に空間が空かないように SDS-PAGE 上に載せ，0.5%(w/v) アガロースゲル溶液で封入する．

5．二次元目の電気泳動を行う．

等電点電気泳動にアガロースゲルを用いた場合の二次元目の電気泳動．

等電点電気泳動にアガロースゲルを用いた場合では，IPG ゲルストリップのようにプラスチック板が付いていないので壊れやすい．このため一次元目のゲルを二次元目の濃縮ゲル上にキャピラリー管から直接押し出す．アガロースゲルと濃縮ゲルの間に隙間を作らないために，二次元目のゲルは濃縮ゲルをゲル板の上端までつくる．

1．封入用アガロースゲル{0.8%(w/v)低融点アガロース(核酸用)，10%(v/v)SDS-PAGE 用変性液{40 mM DTT，5.2%(w/v)LDS，172 mM Tris-HCl pH 6.8 (25℃)，0.5 M sucrose，0.01% BPB}，電子レンジで作成｝を準備する．

2．キャピラリー管を泳動装置から取り出し，透析膜を外す．

3．キャピラリー管の一端に 1 ml サイズのピペットバルブをつけ，アガロースゲルを二次元目の濃縮ゲル上に押し出す．

4．封入用アガロース液を注ぐ．溶液の温度が高すぎる

と等電点アガロースゲルが溶けるので注意する．
5．二次元目の電気泳動を行う．

## 6.e.7　銀染色

SDS-PAGEが終了したら，タンパク質を銀染色で検出する．通常の銀染色法で用いるグルタルアルデヒドは，タンパク質を化学架橋するので，質量分析が目的の場合は使用しない．高感度な染色法なので，必ず手袋を装着して行う．使用する水は蒸留水または超純水を用い，固定液以外の溶液は必ず使用直前に調製する．ここに示す液量は15 cm x 15 cmの容器を基準としている．

1．100 mlの固定液{40%(v/v)メタノール，10%(v/v)酢酸}で30分間振盪しゲルを固定する．この状態で中断することができる．
2．固定液を捨て，水で10分間振盪しゲルを洗浄する．3回繰り返す．
3．100 mlの0.02%(w/v)$Na_2S_2O_3$で1分間振盪する．
4．水で10分間振盪しゲルを洗浄する．3回繰り返す．この洗浄操作が不十分な場合，硝酸銀溶液を加えたときにバックグラウンドが茶色に着色する．
5．100 mlの0.2%(w/v)$AgNO_3$でゲルを30分間振盪する．使用済みの硝酸銀溶液は別個に廃液入れを用意し，塩酸を加えて塩化銀の粗大沈殿を生じさせる．後日，廃液の上清をろ過し，低pH廃液として処分する．
6．5の間に発色液{3%(w/v)$Na_2CO_3$，0.05%(v/v)HCHO}を250 ml調製し冷やしておく．
7．発色操作のとき，容器の下に白い紙を敷くと，発色してくるタンパクを視認しやすい．廃液入れを二つ(A，B)用意する．硝酸銀溶液を廃液入れAに捨てる．水を100 ml注ぎ，ゲルが容器の底面につかないように容器を振盪させてゲルを軽くすすぎ，廃液入れAに捨てる．この操作をもう一度繰り返す（洗いすぎると発色しなくなるので注意する）．発色液を入れ，ゲルを底面につけることなく容器を振盪させ，常に発色液をかくはんさせる．目的とするタンパクが検出されたら使用済みの発色液を廃液入れBに捨て，速やかに次のステップに移る
8．150 mlの固定液を加え5分間振盪して発色反応を停止する．
9．酢酸臭がなくなるまでゲルを水洗する．4℃でゲルを水中に保存可能だが，時間経過に伴いコントラストが失われていくので注意する（図3）．

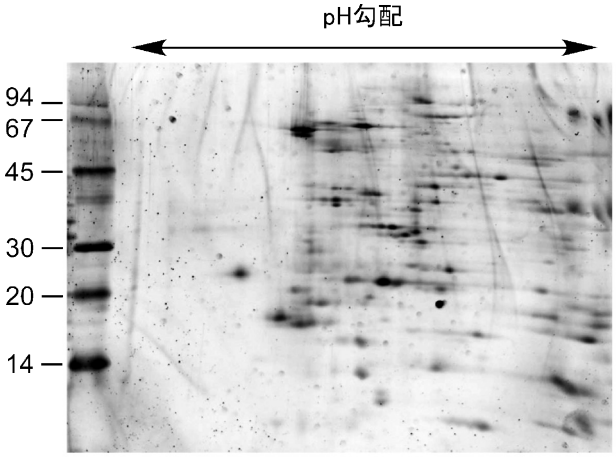



**図3**：二次元電気泳動による膜タンパク質の分離
クラミドモナスの膜タンパク質を多く含むサンプルを分離した後，スポットを銀染色した．左のレーンはタンパク質分子量マーカーである．

## 6.e.8　タンパク質のゲル内消化 (In-gel digestion)

ゲル内消化では一般的にトリプシンを使うが，Arg残基で化学架橋した産物を同定するための質量分析には，Lys-CやV8 proteaseを使うこともある[11]．還元されたシステイン残基が再酸化されないようにヨードアセトアミド処理をする（カルボキシアミドメチルシステインとなり質量が57.022 Da増加する）こともある[12]．しかし，この操作を省略しても質量分析に問題はほとんど生じない[13,14]．水は超純水を使い，使用する溶液のうち，ストック溶液以外は必ず使用直前に調製する．作業には手袋を着用し，使用するチップ・チューブはオートクレーブしない．1.5 mlのチューブを使用する例を示すが，非常に小さいゲル片を取り扱う場合は0.2 mlや0.5 mlのチューブを使うこともある．ステップ1，5，は−80℃で，7は乾燥した状態で，それぞれ操作を中断することができる．

1．100%エタノールで刃を洗浄したのち，ゲルからバンド・スポットを切りだし，ゲル片が大きいときは一辺1〜2 mm程度の立方体2，3個にする（図4 A）．
2．水500 $\mu$lを加えボルテックスし，水を捨てる．4回繰り返す
3．銀染色液脱色液{30 mM $K_3[Fe(CN)_6]$と100 mM $Na_2S_2O_3$を等量混合させる．}を100 $\mu$l加え，8分間静置する．
4．脱色液を捨て，水500 $\mu$lを加えてボルテックスし水を捨てる．
5．4を4回繰り返す．4回で不十分な場合はゲルが無

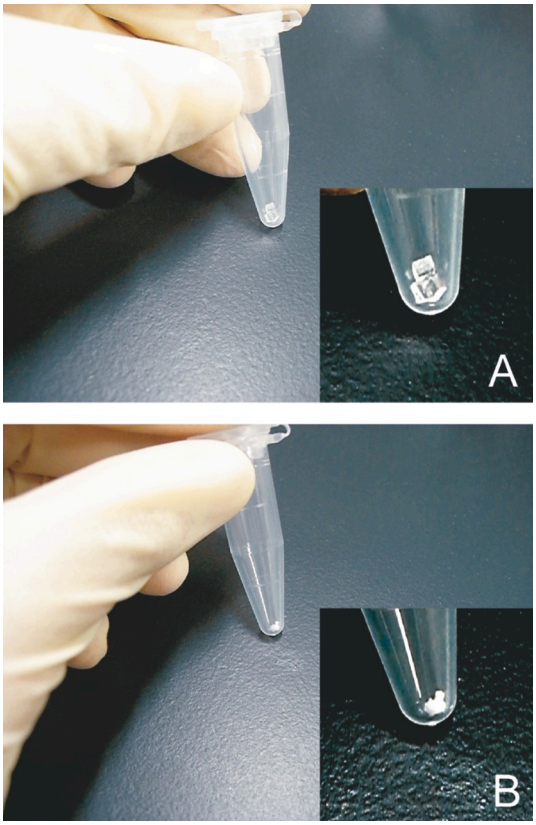



**図4**：ゲル内消化前後のゲル片の様子
A；切り出したゲル片．一辺1 mm程度の立方体2，3個に切りそろえておくと作業しやすい．B；遠心濃縮機によって乾燥したゲル片．白く小さいゲル片になっている．この状態は静電気によって飛びやすいので注意する．

色になるまで繰り返す．

6．アセトニトリル（ACN）溶液（ACN：水＝3：2，(v/v)）を500 μl加えボルテックス後20分間静置する．

7．溶液を除去して遠心濃縮機で乾燥させる（20分間程度）．白く小さくなって，ゲル片が十分に乾燥しているかを確認する．乾燥したゲル片は静電気により飛びやすいので注意する（図4 B）．

8．50 μlの50 mM $NH_4HCO_3$（1 Mストックより調製）を加え10分間静置する．

9．50 mM $NH_4HCO_3$溶液を除去する．除去した体積を記録し，減少した体積から必要なトリプシン溶液の体積をあらかじめ把握する．

10．6から9をもう一度繰り返したあと，6から7を行う．

11．トリプシン溶液{60 ng trypsin/μl溶液．sequencing grade, modified trypsin, Promega(cat. V5111)20 μg/vialに，40 μlのtrypsin resuspension buffer（トリプシンに付属）と293 μlの50 mM $NH_4HCO_3$を加える．調製後は冷蔵保存し2週間程度で使い切る．}をゲル片に各10 μl加え，氷上に20分間静置する．

12．余分なトリプシン溶液を除き，30 μlの50 mM $NH_4HCO_3$を加える．

13．30°Cで15分間インキュベート後37°Cで16時間インキュベートする．

14．50 mM $NH_4HCO_3$を新しいチューブに移し，ACN溶液(ACN：水＝3：2，(v/v))を20 μl加えて21,500 g，25°Cで20分間遠心する．微少なゲル片を吸わないように上清を回収後，さらにACN溶液{ACN：水＝3：2，(v/v)}とACNを各10 μlずつ加え，21,500 g，25°Cで25分間遠心し，上清を回収する．

15．14で回収した上清が完全に乾固するまで遠心濃縮機で乾燥させる（1時間程度）．

16．分析まで−80°Cで保存する．

### 固相カラムによる精製

LC-MS/MSの場合，トラップカートリッジが装着されている機器では精製は必要ない．

1．乾固させたサンプルに溶液2{アセトニトリル2％(v/v)，TFA 0.1％(v/v)}を30 μl加え，ボルテックスする．

2．微量遠心機で5分間最高回転数で遠心して，沈殿した微少なゲル片を吸わないようにして上清を25 μl回収し，バイアルに入れ，オートサンプラーにセットする．

しかしながら，LC-MS/MSのラインやカラムは非常に細いので，微少なゲル片の混入は機器の不具合を起こすこともある．遠心分離による微粒子除去が技術的に難しい場合はスピンカラムを使うこともある（ペプチド低吸着タイプのメンブレンで，孔径は0.2 μm）が，ここでは固相カラムC-TIP（AMR, Japan）による精製例を紹介する．MALDI-TOF/MSでは塩類の混入が分析に影響するので，固相カラムによる精製は必要である．

1．C-TIP（規格10 μl）を1.5 mlチューブに入れる．

2．洗浄のために，C-TIPの上側から溶液1{アセトニトリル90％(v/v)，TFA 0.1％(v/v)}を10 μl注ぐ．

3．C-TIPを2,000 gで15秒間遠心する．溶液1がチップ先端から流れ出ることを確認する．

4．溶液2{アセトニトリル2％(v/v)，TFA 0.1％(v/v)}でステップ2と3を行い，C-TIP先端のカラムを湿潤状態にする．

5．C-TIPを入れているチューブを新しいものに替えて，2,000 gで10秒間遠心してカラムの上に液が残らないようにする．

6．溶液 2 で懸濁したサンプル溶液を 2 の方法で注ぐ．カラムの上から液がなくなるまで 500 g で遠心してサンプルをカラムに吸着させる．
7．洗浄のために溶液 2 をステップ 2 の要領で C-TIP の上側に注入し，2,000 g で 15 秒間遠心する．
8．7 をもう一度行い，C-TIP を入れているチューブを新しいものに替えて，2,000 g で 10 秒間遠心してカラムの上に液が残らないようにする．
9．ステップ 2 の要領で，溶出のために 10 μl の溶液 1 を C-TIP に注入する．
10．500 g で約 10 秒間遠心して溶出させる．
11．濃縮遠心機で乾固させる．
12．NSI-MS/MS では溶液 2 に懸濁しバイアルにセットする．MALDI-TOF/MS では，0.1%(v/v)TFA 溶液に懸濁しマトリックス溶液｛様々なマトリックスがあるが，ここでは一例を挙げる．2 mg（α-cyano-4-hydroxy-cinnamicacid）を，超音波などを使って 100 μl の 50%(v/v)ACN，0.1% TFA(v/v)に完全に溶解させる．飽和溶液なので沈殿が少し残る．｝と混和させターゲットプレート（金属製）の所定スポット上に結晶を作る．

### 分析例

LC-MS/MS の場合，カラムから分離されるペプチドを連続的にイオン化し分析する．ペプチドの種類が多く検出に十分な濃度である場合やリン酸化部位を同定する場合は，取得する情報を増やすために LC の溶出溶液のアセトニトリル濃度の勾配をゆるくして長時間かけて溶出する．ペプチドの種類が少なく検出限界近くの濃度である場合はアセトニトリルの濃度溶液の勾配をきつくして短時間で溶出する．溶液 A｛アセトニトリル 2%(v/v)，ギ酸 0.1%(v/v)｝と溶液 B｛アセトニトリル 90%(v/v)，ギ酸 0.1%(v/v)｝を使う場合をここに紹介する．

比較的短時間な 35 分間の溶出では，B 溶液の濃度を 5%から 75%まで 20 分間かけて上げ，その後一気に 95%まで上げて 5 分間維持し，5%に戻す．比較的長時間な 60 分間の溶出では，B 溶液の濃度を 5%から 95%まで 50 分間かけて上げ，その濃度で 5 分間維持し，5%に戻す．

MALDI-TOF/MS の場合は，サンプルとマトリックスを混和させて作った結晶をパルスレーザーで撃つ．分析時間は 1 スポットあたり数分以内だが，LC-MS/MS と異なり，多数のタンパク質が様々な濃度で混在している場合や低分子質量の夾雑物が多い場合，ペプチドが一本しか存在しない場合は，タンパク質の同定が難しい．

### データ解析（図 5）

市販の解析ソフトを使うのが一般的である．購入が難しい場合は，データを抽出して Web サイト（http://www.matrixscience.com/や http://prospector.ucsf.edu/）で解析するか，自作サーバー上で解析する．

解析アルゴリズムは MASCOT[15] と SEQUEST[16,17] がよく使われる．MASCOT を使った解析では得られた質量の情報を網羅的に検索し，結果は P(Probability)という確率で表される．SEQUEST を使った解析ではシグナル強度の情報も加味して，X-corr(cross correlation)という相関係数の値で結果が表される．いずれの解析ア

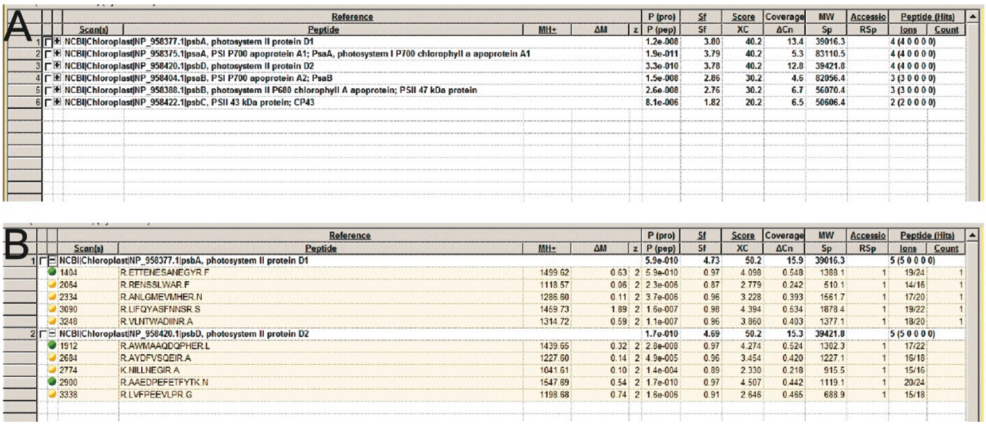



**図 5**：解析の結果
A；異なる分子質量のタンパク質が同一サンプルに同定された例．見かけ上 66 kDa 付近に分離された PsaA と PsaB に相当するバンドを分析した結果，見かけ上 32 kDa の D1(PsbA) と D2(PsbD)，45 kDa 付近の CP43（PsbC）と CP47（PsbB）由来のポリペプチドのシグナルも検出された．本来は PsaA と PsaB のみが検出されるはずであるが，D1 と D2 は凝集し PsaA と PsaB の位置に泳動されたことにより検出されたと考えられる．また，ゲルを切り出すときに刃の洗浄が不十分であったために，直前に切り出した CP43 と CP47 は混入したと考えられる．B；同一サンプルに，ほぼ同じ分子質量のタンパク質が同じ程度の確からしさで同定された例．SDS-PAGE によるタンパク質分離が不十分で，D1 と D2 が重なって泳動されたことが原因と考えられる．

ルゴリズムも得られた値が大きいほど信頼性が高い．MALDI-TOF/MS などペプチドを開裂させない MS 解析では，得られた前駆体イオンの質量とデータベースを照合する解析（前駆体イオンにおける PMF（Peptide Mass Fingerprinting）解析）を行うことが多いので MASCOT がよく使われ，タンパク質単位で結果を解釈する．これに対してペプチドを開裂させアミノ酸配列情報を得る LC-MS/MS 解析は MASCOT と SEQUEST のいずれかが使われ，ペプチド単位で結果を解釈する．

SEQUEST を使った解析結果の実例を図 5 に示す．明らかに異なる分子質量のタンパク質が同定された場合，凝集産物や分解産物が重なって泳動している，切り出し時に混入した可能性がある（図 5 A）．また，LC-MS/MS の場合は先に分析したサンプルが経路に残って次の分析に持ち越された（キャリーオーバー）可能性も考えられる．このような場合，LC にインジェクションする量を減らすか，サンプルを含まない溶液（ブランク）をサンプルの直後にインジェクションし，どれほどのペプチドが次の分析に持ち越されているか様子を見る．似た分子質量のタンパク質が同定された場合，一方が圧倒的に高い値を持っているならば，値の高い方が真のタンパク質，あるいは量の多いタンパク質であるとする．同程度の値の場合（図 5 B），電気泳動による分離が不十分であるために，同じバンド・スポットにタンパクが重なっていると解釈する．

### リン酸化部位の同定（図 6）

質量分析計はタンパク質を同定すると同時に翻訳後修飾に関する情報も得られる．例えば，ESI（NSI）-MS では，二度イオンを開裂させる MS/MS/MS によってリン酸化部位を特定できる．

リン酸化されたペプチドは，一度目の開裂ではペプチド結合よりリン酸基の開裂が主に起こる．したがって，リン酸化ペプチドは，一度目の開裂で脱リン酸化に相当する質量が減少するペプチドとして同定される（価数が変わらず質量が減少するため，ニュートラルロス（Neutral loss）という）．もしリン酸化されたペプチド内にリン酸化修飾を受ける可能性のある残基（Ser，Thr，Tyr）が複数存在すると，リン酸化部位は同定できない．しかし，脱リン酸化には脱水反応が伴うので，18 Da の質量減少が生じる．これを利用して，脱リン酸化した前駆体イオンをさらにもう一度開裂させて脱水により質量減少したプロダクトイオンの情報を利用してリン酸化部位を特定する．図 6 では $y_3^+$, $y_2^+$, $b_3^+$ において質量が減少していることから，これらに共通して存在する $R_3$ で脱リン酸化による脱水反応が起きていると言える．したがって，$R_3$ がリン酸化部位であると特定できる．

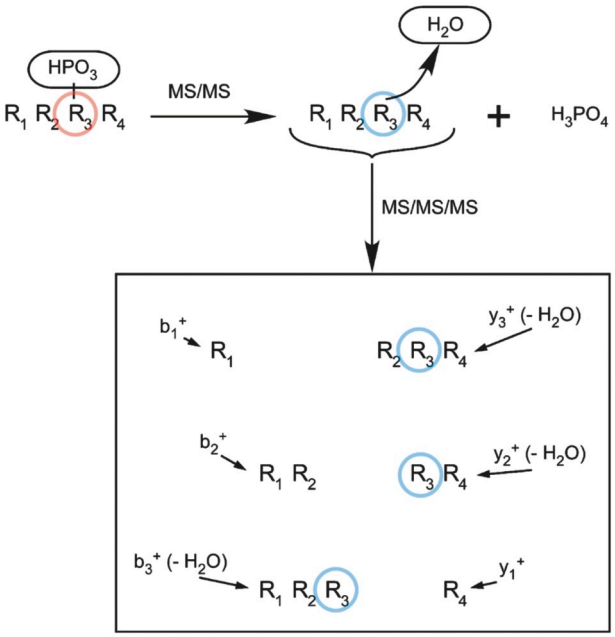



**図 6**：ニュートラルロスを利用したリン酸化残基の同定
桃色で示した残基（図では $R_3$）がリン酸化したペプチドを MS/MS にかけると脱リン酸化し $R_3$ の側鎖が脱水する．脱リン酸化したペプチドを前駆体イオンとしてさらに MS/MS/MS を行う．水色で示した部位では脱水化により質量が 18 kDa 減少しているとする．

この手法でリン酸化部位を特定するには比較的大量のリン酸化ペプチドを必要とするので，金属カラム（鉄やガリウム，チタンなどの金属を使った IMAC（Immobilized metal affinity column）を使う）でリン酸化ペプチドを濃縮したサンプルを分析する．ゲル内消化の過程で脱リン酸化しやすいので，リン酸化タンパク質は電気泳動で分離せず，溶液のままトリプシンでタンパク質を消化し（In-solution digestion）分析することもある[18,19]．

## 参考文献


1）F. Sommer, F. Drepper, W. Haehnel, & M. Hippler, J Biol Chem **281** (2006) P.35097.
2）M. Hippler, J. Klein, A. Fink, T. Allinger, & P. Hoerth, Plant J **28** (2001) P.595.
3）E. J. Stauber & M. Hippler, Plant Physiol Biochem **42** (2004) P.989.
4）P. H. O'Farrell, J Biol Chem **250** (1975) P.4007.
5）Y. Akiyama & K. Ito, EMBO J **4** (1985) P.3351.
6）T. Rabilloud, C. Adessi, A. Giraudel, & J. Lunardi, Electrophoresis **18** (1997) P.307.
7）T. Rabilloud, Electrophoresis **19** (1998) P.758.

8）D. Seigneurin-Berny, N. Rolland, J. Garin, & J. Joyard, Plant J **19** (1999) P.217.
9）Y. Kashino, T. Harayama, H. B. Pakrasi, & K. Satoh, J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci **849** (2007) P.282.
10）D. Wessel & U. I. Flugge, Anal Biochem **138** (1984) P. 141.
11）A. Tohri, N. Dohmae, T. Suzuki, H. Ohta, Y. Inoue, & I. Enami, Eur J Biochem **271** (2004) P.962.
12）A. Shevchenko, M. Wilm, O. Vorm, & M. Mann, Anal Chem **68** (1996) P.850.
13）K. Speicher, O Kolbas, S. Harper, & D. Speicher, J Biomol Tech **11** (2000) P.74.
14）B. Granvogl, P. Gruber, & L. A. Eichacker, Proteomics **7** (2007) P.642.
15）D. N. Perkins, D. J. Pappin, D. M. Creasy, & J. S. Cottrell, Electrophoresis **20** (1999) P.3551.
16）Jimmy K. Eng, Ashley L. McCormack, & John R. Yates, Journal of the American Society for Mass Spectrom **5** (1994) P.976.
17）J. R. Yates, 3rd, J. K. Eng, A. L. McCormack, & D. Schieltz, Anal Chem **67** (1995) P.1426.
18）M. V. Turkina, J. Kargul, A. Blanco-Rivero, A. Villarejo, J. Barber, & A. V. Vener, Cell Proteomics **5** (2006) P. 1412.
19）A. V. Vener, Biochim Biophys Acta **1767** (2007) P.449.

# 6．タンパク質
## f．カラムクロマトグラフィー

小澤真一郎[1)]，岡室　　彰[1)]，高橋裕一郎[1)]

可溶性および膜タンパク質の精製においてカラムクロマトグラフィーは最も有効な手法の一つである．本章では，一般的によく使われるカラムクロマトグラフィーの方法について紹介する．

## Column chromatography

Shin-ichiro Ozawa, Akira Okamuro, Yuichiro Takahashi

Column chromatography is one of the most useful methods for purification of solubile and membrane proteins. In this chapter, principle and application of variable column choromatographies is presented.

### 6.f.1　カラムクロマトグラフィーに必要な装置

タンパク質精製のクロマトグラフィーに必要な機器は，用いる担体の種類やカラムサイズにより異なる．一般的に必要な基本構成は，カラム，（ペリスタ）ポンプ，モニターとレコーダー，フラクションコレクターとそれらをつなぐチューブ・コネクター類などである．図1にイオン交換クロマトグラフィーの基本構成を示す．試料溶液と溶出溶液の塩濃度の勾配を作成するグラディエントメーカーをそれぞれ三方コックを介してカラムにつなぐ．静水圧を利用して溶液をカラムに送ることは可能であるが，ここではペリスタポンプでカラムへ送液する．アフィニティークロマトグラフィーなどで用いる小さなカラムのときは，ポンプやフラクションコレクターは必ずしも必要ない．イオン交換，ヒドロキシアパタイト，および疎水性相互作用クロマトグラフィーには，溶出溶液の塩濃度の勾配を作成するためグラディエントメーカーが必要である．また，精製中のタンパク質の変成を防ぐため，クロマトグラフィーは低温室もしくはクロマトチェンバー内（4°C）で行う．自分でカラムを作成するときは，担体を均一に充填することが，高い分離の必要条件である．ゲルろ過用の1 mもの長いカラムを作成するときは特に重要で，リザーバーを利用するとよい．担体によっては様々な種類のプレパックカラムが利用できる．低圧用のプレパックカラムはペリスタポンプでも使用できる．しかし，a圧用のプレパックカラムは，a圧用のポンプで送液しなければならない．

カラムクロマトグラフィーの操作には経験と独自の工夫が必要である．そのため，マニュアル化された操作に慣れている人にとっては，初めはとまどいを感じるかもしれない．しかし，半自動式クロマトグラフィー装置（BioLogic LP, BioRad）などが利用できれば操作の負担は軽くなる（図2）．この装置ではペリスタポンプを使用

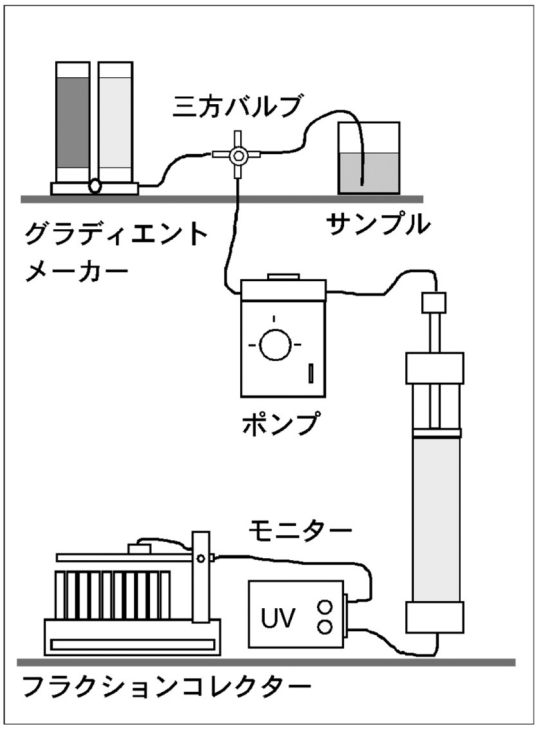



図1：カラムクロマトグラフィー装置のセッティング
イオン交換クロマトグラフィーに用いる溶出溶液の塩濃度に勾配をかけてサンプルを分離する方法の例を示す．グラディエントメーカー，三方バルブ，カラム，ペリスタポンプ，モニター，フラクションコレクターがチューブにより連結されている．ポンプがない場合は，静水圧を利用して溶出する．三方バルブがあると試料添加に便利である．カラムに詰めた担体の上端に隙間が空くので伸縮式のアダプターを取り付けるとよい．モニターがない場合は，分画した各画分の280 nmもしくは適当な波長での吸光度を測定しグラフにする．

1）岡山大学大学院自然科学研究科

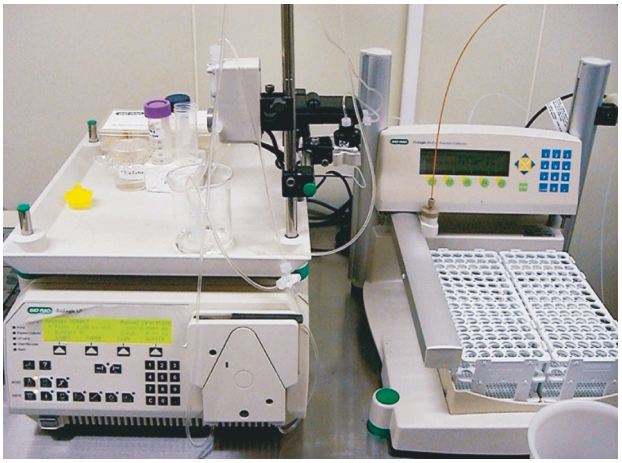


図2：低圧クロマトグラフィー装置
ポンプ，モニター，カラムスタンド，フラクションコレクターの他に，送液時間，送液速度，グラディエント作成，モニターによる溶出の記録，などがコントロールできるようになっている．

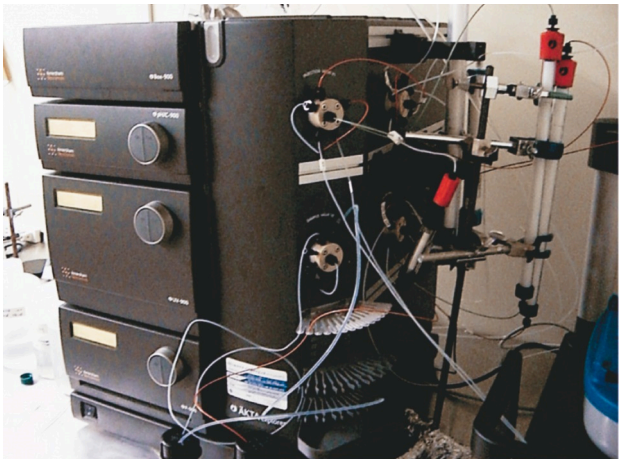


図3：中圧クロマトグラフィー装置
コンピューターで制御して試料添加，溶出を自動で行う中圧カラムクロマトグラフィー装置で，プレパックのカラムを用いる．溶出の送液速度を速くできるため，高い分離を保ちながら分離時間を大幅に短縮できる利点がある．特に，ゲルろ過カラムクロマトグラフィーの分離が優れている．

するため，自分で作成したカラムも使用できる．中圧クロマトグラフィー装置（ÄKTA, GE Healthcare）は自動化が進み，速い送液で短時間の分離が可能である（図3）．

## 6.f.2　イオン交換クロマトグラフィー

イオン交換クロマトグラフィー（ion exchange chromatography）は，合成樹脂などの担体に共有結合させた解離基とタンパク質の表面電荷との相互作用を利用してタンパク質を分離する（図4）．水溶性や膜タンパク質の精製に利用でき，再現性よく高い分離が得られる．

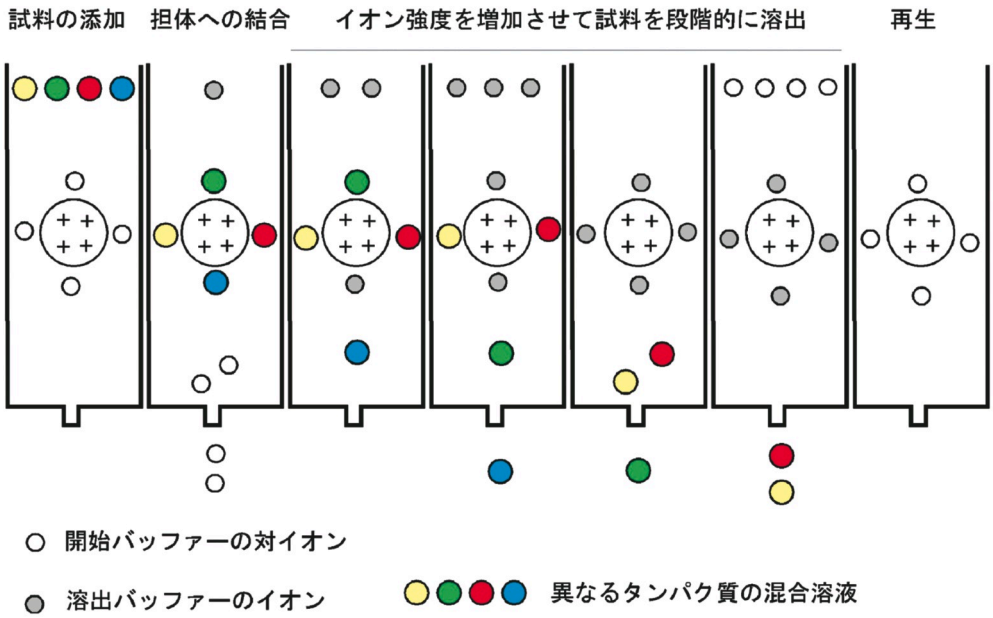



図4：陰イオン交換カラムの原理
陰イオン交換体による異なるタンパク質の分離の様子を模式的に示した．試料を添加すると負電荷をもつタンパク質は開始バッファーの対イオン（$Cl^-$）と置き換わり担体に結合する．溶出バッファーのイオン強度を増加させると，担体に結合したタンパク質は溶出バッファーの対イオン（$Cl^-$）と置き換わり溶出される．タンパク質の担体への結合強度により，溶出されるときのイオン強度が異なり，タンパク質は分離される．

**表1**：イオン交換カラムクロマトグラフィーの担体

| 陰イオン | Functional group name | 解離基／官能基 |
|---|---|---|
| 弱塩基 | Diethylaminoethyl（DEAE） | $-CH_2CH_2N^+H(CH_2H_3)_2$ |
| 弱塩基 | Aminoethyl（AE） | $-CH_2CH_2NH_3^+$ |
| 強塩基 | Diethyl-2-hydroxypropylaminoethyl（Quaternary aminoethyl）（QAE） | $-CH_2CH_2N^+(CH_2CH_3)_2CH_2CH(OH)CH_3$ |
| 強塩基 | Trimethylaminomethyl（SuperQ，MonoQ） | $-CH_2N^+(CH_3)_3$ |
| 強塩基 | Triethylaminoethyl（TEAE） | $-CH_2CH_2N^+(CH_2CH_3)_3$ |
| 強塩基 | Dimethyl-2-hydroxyethylaminomethyl | $-CH_2N^+(CH_3)_2CH_2CH_2OH$ |
| 陽イオン | | |
| 弱酸 | Carboxymethyl（CM） | $-CH_2COO^-$ |
| 弱酸 | Carboxy（C） | $-COO^-$ |
| 強酸 | Sulphopropyl（SP） | $-CH_2CH_2CH_2SO_3^-$ |
| 強酸 | Sulphoethyl（SE） | $-CH_2CH_2SO_3^-$ |
| 強酸 | Sulphomethyl（SM）（Mono S） | $-CH_2SO_3^-$ |
| 強酸 | Sulpho | $-SO_3^-$ |

解離基が正電荷をもつ場合は，タンパク質表面の負電荷と結合するため，陰イオン交換体と呼ばれる．それに対して解離基が負電荷をもつ場合は，陽イオン交換体と呼ばれる（表1）．いずれも弱および強イオン交換体がある．弱イオン交換体は結合容量が小さく，イオン化がpH依存性を示す．一方，強イオン交換体は幅広いpH領域でイオン化し，タンパク質の結合容量が大きい．

中性付近のpHでは正の電荷をもつタンパク質が多いため，陰イオン交換体がタンパク質の精製に多用されている．弱陰イオン交換体として一般的に利用される官能基は，Diethylaminoethyl（DEAE）である．一方，強陰イオン交換体として第4級アミノエチルが利用される．Trimethylaminoethyl基は，Mono Q（GE Healthcare）やSuper Q（東ソー）に使用され，プレパックカラムとして市販されている．弱陽イオン交換体として最も一般的に利用される官能基はカルボキシル基を含むCarboxymethyl（CM）である．強い結合性の官能基はスルホ基を含む．Mono S（GE Healthcare）はSulphomethyl基を含み，SPシリーズ（東ソー）はSulphopropyl基を含む．

図4に陰イオン交換カラムでタンパク質を分離する様子を模式的に示した．陰イオン交換体には開始バッファーの対イオンである$Cl^-$が結合する．試料を添加すると，交換体はタンパク質を結合し，対イオンは遊離される．次に溶出バッファーの塩濃度（NaClもしくはKCl）を増加させると，交換体への結合の強さに応じてタンパク質が順次溶出される．高塩濃度の溶出液でタンパク質をすべて溶出した後，開始バッファーで置き換えるとカラムを再生することができる．試料をカラムに吸着させるとき，目的のタンパク質が溶出しない程度の塩を試料溶液に加えておくと，低塩濃度で溶出するタンパク質の吸着を抑えることができる．そうすると，多数のタンパク質が含まれる試料では，目的のタンパク質をカラムにより多く吸着させることができる．

### 6.f.2.1　DEAEカラムクロマトグラフィーによる水溶性タンパク質の分離

図5に緑藻クラミドモナスの水溶性タンパク質の分離例を示す．凍結融解を繰り返して細胞を破壊し，得られた水溶性タンパク質をDEAEカラムに吸着させ，展開溶液中のKCl濃度を0から500 mMまで増加したときに溶出されるタンパク質を示した．ここでは，プラストシアニン（Pc），フェレドキシン（Fd），フェレドキシンNADP還元酵素（FNR），リブロースビスリン酸カルボキシラーゼオキシゲナーゼの大サブユニット（Ls）と小サブユニット（Ss）の分離に注目する．

**[実験方法]**

1．直径2.5 cmのエコノカラム（Bio-Rad）にDEAE Toyopearl 650S（東ソー）を高さ7 cm充填する（カラム体積は34 ml）．
2．20 mM Tricine-NaOH pH 7.8でカラムを平衡化する．
3．1 ml/minで試料を吸着させる．この時，必要であれば非吸着画分も回収する．
4．20 mM Tricine-NaOH pH 7.8に0–500 mM KClの濃度勾配をかけながら，流速0.4 ml/minで溶出する．5 mlずつ80フラクションに分画する．

細胞から抽出した水溶性タンパク質の試料（レーン1）と溶出された画分のうち18画分（レーン2–19）のタンパク質をSDS-PAGEで分離し，CBBで染色した（図5）．試料には細胞質と葉緑体などのオルガネラのすべての水

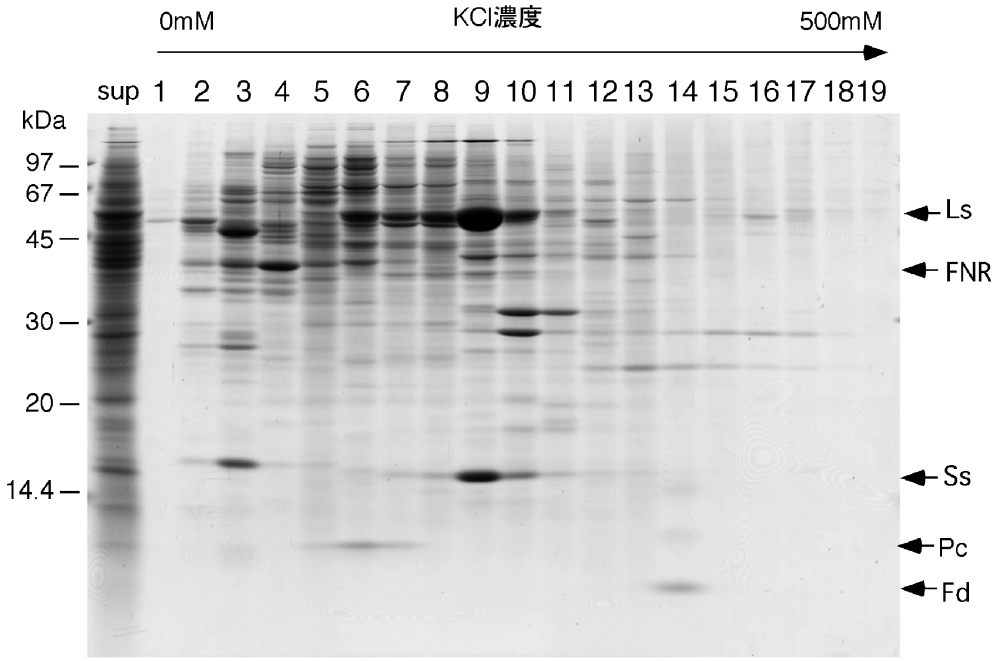



**図5**：DEAE クロマトグラフィーによる水溶性タンパク質の分離
緑藻クラミドモナスの細胞から水溶性タンパク質を抽出し，DEAE クロマトグラフィーで 0–500 mM KCl の濃度勾配を含む溶出溶液で分離した．得られた画分のタンパク質組成を SDS-PAGE で分析した．FNR；フェッレドキシン NADP 還元酵素，Fd；フェレドキシン，Pc；プラストシアニン，Ls；リブロースビスリン酸カルボキシラーゼオキシゲナーゼ大サブユニット，Ss；リブロースビスリン酸カルボキシラーゼオキシゲナーゼ小サブユニット．

溶性タンパク質が含まれているため，多数のバンドが検出される．レーン 2–19 のタンパク質組成を観察すると，異なるタンパク質が分離される様子が分かる．低塩濃度のレーン 3–4 に約 40 kDa の FNR が，100–150 mM KCl 付近のレーン 5–7 に Pc が，350 mM KCl 付近のレーン 14 に Fd が分離された．レーン 10 に分離された約 50 kDa と 15 kDa のバンドは，それぞれ Rubisco の大および小サブユニットである．最初の試料には多数のタンパク質が含まれているので，分離後の各画分にはまだ複数のタンパク質が含まれている．精製を改善するには，カラムに充填する担体を増やし，別の精製法も組み合わせる．

### 6.f.2.2 DEAE カラムクロマトグラフィーによる膜タンパク質の分離

膜タンパク質も水溶性タンパク質と同様に分離することができるが，タンパク質を凝集させないようにするため，溶液に CMC 以上の濃度の非イオン性界面活性剤を加える．緑藻クラミドモナスから単離したチラコイド膜を非イオン性界面活性剤で可溶化して得られるクロロフィルタンパク質の分離例を図 6 に示す．

**[実験方法]**

1．直径 2.5 cm のエコノカラム（Bio-Rad 社製）に DEAE Toyopearl 650S（東ソー）を高さ 7 cm 充填する（カラム体積は 34 ml）．
2．50 mM Tris-HCl，pH 8.0，0.05%ドデシルマルトシド（DM）の溶液でカラムを平衡化する．
3．0.5 ml/min で試料（ショ糖密度勾配超遠心法で分離した A2 画分）を吸着させる．
4．吸着された緑色の試料は 1–2 cm 位の高さになる．
5．50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.05% DM 溶液に 0–150 mM NaCl の濃度勾配をかけながら，流速 0.5 ml/min で溶出する．溶出容量は 300 ml である．

分離に用いた試料は，チラコイド膜を DM で可溶化し，ショ糖密度勾配超遠心法で分離した A2 画分である．この画分には複数の複合体と光化学系 II コア複合体の解体産物が混ざっているが，それぞれは溶出曲線のピークもしくは肩として分離されている．ただし，LHCI 複合体だけは広範囲の NaCl 濃度で溶出されている．これは，LHCI は光化学系 I 複合体から解体した後も多量体を維持しているが，部分的に解体しヘテロな状態であるからだと考えられる．多数のサブユニットから構成される複合体を精製する場合，ここでの LHCI や光化学系 II 複合体の様に，本来は均質な複合体でも精製の過程で部分解体することがある．したがって，部分解体を最小限にす

るには，分離時間，温度，界面活性剤，緩衝液および塩濃度の設定を最適化しなければならない．

### 6.f.3　ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー

タンパク質とヒドロキシアパタイトの相互作用は，主としてタンパク質表面の負電荷とヒドロキシアパタイトの $Ca^{2+}$ との静電的な結合により引き起こされる．したがって，タンパク質の分離は陰イオン交換カラムクロマトグラフィーと似ているが，タンパク質表面の正電荷とヒドロキシアパタイトのリン酸基との相互作用も生じているため，分離パターンが異なってくる場合もある．

カラムに吸着したタンパク質を溶出するには，$Ca^{2+}$ と強い親和性をもつリン酸などの陰イオンの濃度を上げていく．例えば，リン酸ナトリウムもしくはリン酸カリウムの濃度をそれぞれ 10–150 mM もしくは 10–200 mM の範囲で使用する．溶出溶液中のイオン強度を高くすると（例えば 250–500 mM NaCl），タンパク質の溶出に必要なリン酸緩衝液濃度が低下することがある．溶出時のリン酸緩衝液の濃度を低くしたいときは試してみるとよい．

図 7 は，DEAE クロマトグラフィーで分離した Pc に富む画分（図 5，レーン 4-6）をヒドロキシアパタイトクロマトグラフィーでさらに精製した結果である．

[実験方法]

1．直径 1 cm のエコノカラム（Bio-Rad）にヒドロキシアパタイト（Macro-Prep Ceramic Hydroxyapatite TYPE I 20$\mu$m）（Bio-Rad）を高さ 5 cm 充填する．カラム体積は 4 ml である．
2．20 mM potassium phosphate, pH 7.8 を 1 ml/min, 15 分間流し，カラムを平衡化する．
3．試料を 20 mM potassium phosphate，pH 7.8 で 5 倍に希釈する．
4．試料を 1 ml/min でカラムに吸着させる．
5．20 mM potassium phosphate, pH 7.8 で 1 ml/min, 15 分間カラムを洗う．
6．potassium phosphate, pH 7.8 の濃度勾配を 20–500 mM にして溶出させる．流速 0.4 ml/min，1 ml ずつ 40 フラクションに回収する．
7．500 mM potassium phosphate pH 7.8 で 1.0 ml/min，15 分間カラムを洗う．
8．20–200 mM Potassium phoshate の濃度で溶出され

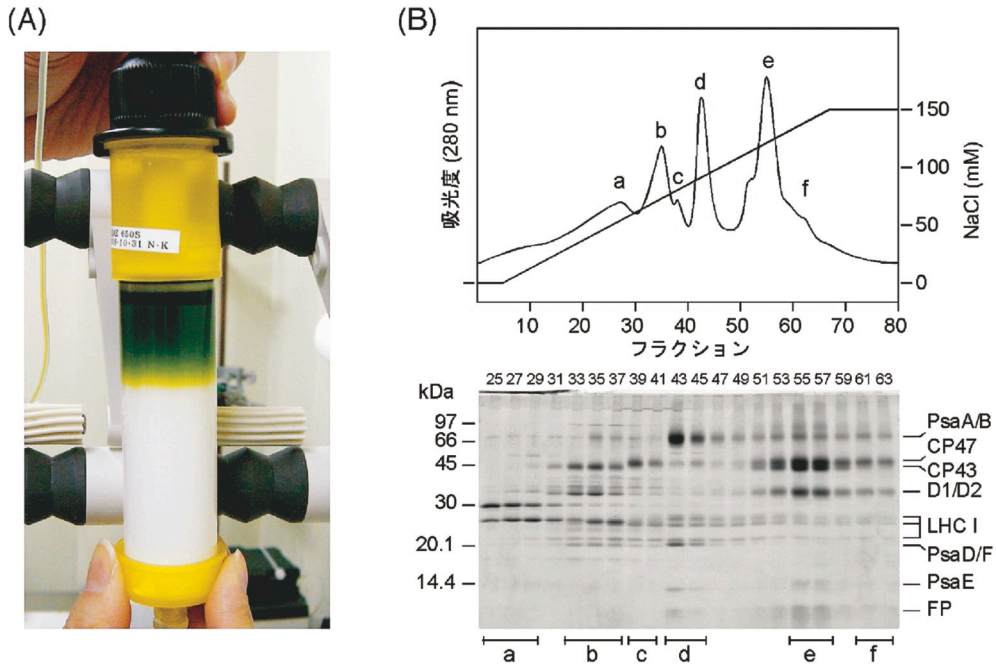



**図 6**：DEAE クロマトグラフィーによる膜タンパク質の分離
緑藻クラミドモナスのチラコイド膜をドデシルマルトシドで可溶化し，ショ糖密度勾配超遠心法で分離して得られた A2 画分を DEAE クロマトグラフィーで分離した．A2 は主に光化学系 II コア複合体を含み，その他に光化学系 I コア複合体，LHCI 複合体，シトクロム $b_6f$ 複合体なども含む．溶出曲線は 280 nm での吸光度を測定して求めた．ここでは a から f で記したピークおよび肩が観察される．a；アンテナ複合体 LHCII，b；光化学系 II のコアアンテナ複合体 CP43，c；光化学系 II のコアアンテナ複合体 CP47，d；光化学系 I コア複合体，e；光化学系 II 複合体，f；CP43 を欠く光化学系 II 複合体．LHCI 複合体は不均一な性質をもつらしく，a を除く各画分に溶出されている．

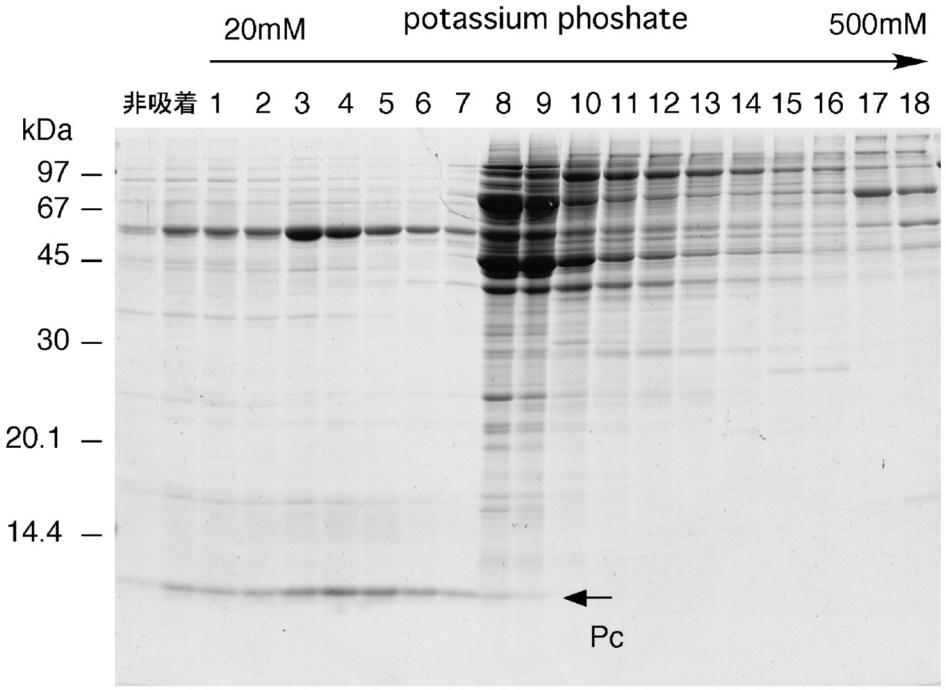



**図7**：ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィーによる分離
図5で分離したPcに富む画分（レーン5-7）をヒドロキシアパタイトカラムに吸着させた．20-500 mMの濃度勾配をもつリン酸カリウム溶液で溶出された各画分をSDS-PAGEで分析した．約10 kDaのPcのバンドを矢印で示した．低濃度のリン酸カリウム溶液で60 kDaタンパク質と共にPcが溶出され，Pcの純度が大きく上がった．

る画分にPcが分離される．

DEAEクロマトグラフィーで精製したPc画分には40〜90 kDaのサイズのタンパク質がかなり混入していた（図5，レーン6）．ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィーにより，Pcは低濃度のPotassium phoshateにより溶出され，混入タンパク質の大部分は200 mM Potassium phoshateの画分に溶出された．したがって，Pcの精製には有効である．しかし，約60 kDaのタンパク質は，低濃度のPotassium phoshateで溶出してくるため完全に除去することはできない．このタンパク質とPcの分子質量の差は大きいので，さらに精製を進めるにはゲルろ過クロマトグラフィーが有効であろう．

## 6.f.4　ゲルろ過クロマトグラフィー

上記のイオン交換やヒロドキシアパタイトクロマトグラフィーと異なり，ゲルろ過クロマトグラフィーではタンパク質は担体へ結合せず，サイズに基づいて分離される．分子のサイズの対数と溶出体積は直線関係になる．したがって，分子量マーカータンパク質を用いて検量線を求めると，目的のタンパク質の見かけの分子量を求めることができる．担体がタンパク質と弱い相互作用をもつときは，展開溶媒中のイオン強度により溶出体積が変化することがある．

ゲルろ過（Gel filtration）クロマトグラフィーに用いる担体は，大きさの異なる網目構造をもつ粒子である．図8Aに，カラムの体積に相当するベッド体積(Vt)，ゲルの体積，排除体積(Vo)の関係を示す．ゲルの体積は，溶液が入り込めるゲル粒子の網目構造の体積（Vi）と溶液が入り込めないゲル粒子そのものの体積（Vp）の合計である．したがって，Vt＝Vo＋Vi＋Vpとなる．溶出溶液のように十分に小さい分子はゲル粒子の網目の内部に浸透するので，カラムを通過するにはVo＋Viの溶液量が必要となる（図8B）．大きな分子はゲル粒子の網目から排除されるため，ゲル粒子を素通りして溶出される．このような大きな分子の溶出体積Voを排除体積（void volume）と呼び，ベッド体積（Vt）のおよそ20%程度に相当する．分子質量2 MDaのBlue Dextran溶液（0.2%）をベッド体積の1%程度を添加し，溶出するまでの溶液量からVoを求める．一方，中間の大きさの分子は網目構造に部分的に浸透するので，溶出体積(Ve)は，Vo＜Ve＜Vt＋Viとなる．このようにして，タンパク質が球状の場合，ゲルろ過クロマトグラフィーでは大きな

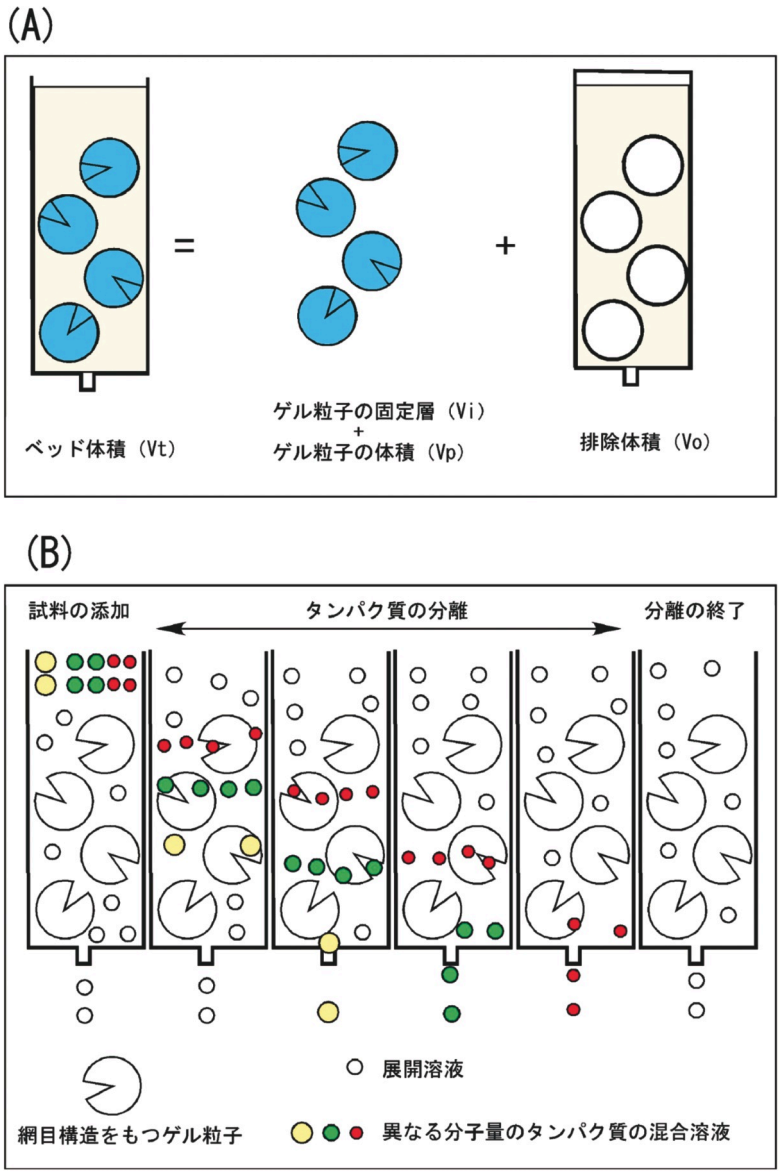



図 8：ゲルろ過クロマトグラフィーによるタンパク質分離の原理
（A）カラムのベッド，ゲル粒子，および排除体積の関係．（B）異なるサイズのタンパク質の分離．

タンパク質が先に溶出される．タンパク質が非対称な形状である場合，溶出体積が影響を受けることがある．ゲルろ過カラムを自分で作成する場合，タンパク質の分離を十分にするためには長さ 1 m 以上が必要となる．しかし，プレパックカラムは分離能が高いため長さ 30–60 cm でも十分である．

ゲルろ過クロマトグラフィーで分離できるタンパク質分子のサイズの範囲（分画範囲）は，ゲル粒子の網目構造の大きさに依存する．様々な網目サイズのゲルろ過用の担体が入手できるので，目的のタンパク質のサイズに最適な担体を選ぶことは重要である（表 2）．一般的にゲルろ過担体の分画範囲は，水溶性タンパク質の分離を目安としている．膜タンパク質は界面活性剤を結合しているので，分離サイズの範囲は狭くなる．一般的には，表示されている分画サイズより小さい膜タンパク質の分離に用いられる．また，分離サイズの小さいゲル粒子（Sephadex G-25 および G-50）は脱塩などに用いる．この場合，タンパク質は排除体積に溶出されるが，低分子の塩は遅れて溶出される．タンパク質の分離には試料をベッド体積の 0.5–4%添加するが，脱塩の場合は 30%まで添加できる．ゲルろ過担体の選択と溶出条件の設定は，製造会社のマニュアルを参考にする．膜タンパク質の分離例は少ないので，以下にクロロフィルタンパク質の分離の例を示す（図 9）．

**表 2**：ゲルろ過クロマトグラフィー用担体

| 充塡用担体 | 製品名 | 分画範囲（kDa） | |
|---|---|---|---|
| Dextran | Sephadex G-25 | ＜1.5 | GE Healthcare |
| | Sephadex G-50 | 1.5–30 | GE Healthcare |
| | Sephadex G-75 | 3–70 | GE Healthcare |
| | Sephadex G-100 | 4–150 | GE Healthcare |
| Polyacrylamide | Bio-Gel P-2 | 0.1–1.8 | Bio-rad |
| | Bio-Gel P-6 | 1–6 | Bio-rad |
| | Bio-Gel P-30 | 1.5–20 | Bio-rad |
| | Bio-Gel P-60 | 3–60 | Bio-rad |
| | Bio-Gel P-100 | 5–100 | Bio-rad |
| Dextran, corss-linked agarose | Sephacryl S-100HR | 1–500 | GE Healthcare |
| | Sephacryl S-200HR | 5–250 | GE Healthcare |
| | Sephacryl S-300HR | 10–1,500 | GE Healthcare |
| | Sephacryl S-400HR | 20–8,000 | GE Healthcare |
| Agarose | Sepharose 6B | 10–4,000 | GE Healthcare |
| | Sepharose 4B | 60–20,000 | GE Healthcare |
| | Sepharose 2B | 70–40,000 | GE Healthcare |
| Polyvinylchloride | TOYOPEARL HW-40 | 0.1–10 | 東ソー |
| | TOYOPEARL HW-50 | 0.5–80 | 東ソー |
| | TOYOPEARL HW-55 | 1–700 | 東ソー |
| | TOYOPEARL HW-65 | 400–5,000 | 東ソー |
| | TOYOPEARL HW-75 | 500–50,000 | 東ソー |
| プレパックカラム | | | |
| Dextran linked to cross-linked agarose | Superdex 75 pg | 10–600 | GE Healthcare |
| | Superdex 200 pg | 10–600 | GE Healthcare |
| | Superose 12 pg | 1–300 | GE Healthcare |
| | Superose 6 pg | 5–5,000 | GE Healthcare |

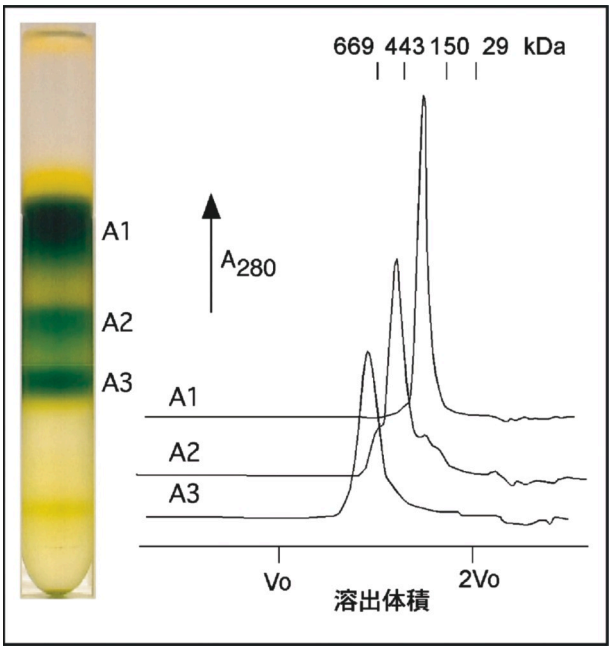



**図 9**：ゲルろ過クロマトグラフィーによるクロロフィルタンパク質の分離
ドデシルマルトシドで緑藻クラミドモナスのチラコイド膜を可溶化しショ糖密度勾配超遠心により分画した 3 種のクロロフィルタンパク質をゲルろ過クロマトグラフィー（Superose 6HR 10/30）でさらに分離した．

チラコイド膜を DM で可溶化し，ショ糖密度勾配超遠心で LHCII，PSII，PSI-LHCI 複合体に相当する A1，A2，A3 画分を分離した．次にそれぞれの画分をゲルろ過クロマトグラフィーに添加し，その分離の様子を比較した．

**［実験方法］**

溶出溶液；0.05%DM，50 mM Tris-HCl，pH 8.0，100mM NaCl，（ただし水溶性マーカータンパク質を分離するときは DM を加えなくてもよい）．カラム；Superose 6 HR 10/20（GE Healthcare），クロマトグラフィーシステム；FPLC もしくは ÄKTA（GE Healthcare），分子量マーカータンパク質；Thyroglobulin（669 kDa），Apoferritin（443 kDa），$\beta$-amylase（200 kDa），Alcoholdehydrogenase（150 kDa），Bovine Serum Albumin（66 kDa），Carbonicanhydrase（29 kDa）．

1．試料を 0.2 $\mu$m のフィルターに通し，不溶物やゴミなどを除去する．
2．試料 200 $\mu$l をカラムに添加する．
3．流速 0.2 ml/min で分離し，280 nm の吸収で溶出液をモニターする．
4．0.4 ml ずつフラクションをとる．

表 3：疎水性相互作用クロマトグラフィーの担体

| 担体 | リガンド | 製造会社 |
|---|---|---|
| RESOURCE ETH | Matrix-$OCH_2CHOHCH_2$-OH | GE Healthcare |
| RESOURCE ISO | Matrix-$OCH_2CHOHCH_2OCH_2CHOHCH_2OCH\ (CH_3)_2$ | GE Healthcare |
| RESOURCE PHE | Matrix-$OCH_2$-$CHOHCH_2OCH_2CHOHCH_2OC_6H_5$ | GE Healthcare |
| Toyopearl Ether | Matrix-$(OCH_2CH_2)_n$OH | 東ソー |
| Toyopearl PPG | Matrix-[]$OCH\ (CH_3)\ CH_2$-]$_n$OH | 東ソー |
| Toyopearl Phenyl | Matrix-$OC_6H_5$ | 東ソー |
| Toyopearl Butyl | Matrix-$OCH_2CH_2CH_2CH_3$ | 東ソー |
| Toyopearl Hexyl | Matrix-$OCH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_3$ | 東ソー |
| Methyl HIC | Matrix-$OCH_3$ | Bio-Rad |
| t-Butyl HIC | Matrix-$OC\ (CH_3)_3$ | Bio-Rad |

膜タンパク質を分離するときは，溶出溶液中に界面活性剤を添加する．マーカータンパク質の溶出体積を溶出曲線の上部に示した．マーカータンパク質は水溶性であるので，溶出溶液中に界面活性剤を加える必要はないが，界面活性剤の有無により溶出体積に差は生じない．ゲルろ過クロマトグラフィーではタンパク質と単体の間に相互作用は基本的にはないはずである．しかし，Superose の担体とタンパク質の間には疎水性相互作用があり，溶出溶液のイオン強度を上げるとタンパク質の溶出が遅くなる．

各クロロフィルタンパク質複合体の見かけのサイズは，A1（LHCII）は約 200 kDa，A2（PSII 複合体）は約 400 kDa，A3（PSI-LHCI 複合体）は約 700 kDa である．ショ糖密度勾配超遠心法では，クロロフィルタンパク質はその密度の差により分離されるはずであるが，密度にあまり差がない場合はサイズによって分離されるようである．確かにゲルろ過クロマトグラフィーとショ糖密度勾配超遠心の分離パターンはよく似ている．

## 6.f.5　疎水性相互作用クロマトグラフィー

用いるゲル担体に疎水性リガンドを導入し，タンパク質の表面の疎水性の差に基づいて分離する．逆相クロマトグラフィーと異なり，導入された疎水性リガンドの密度は低い．したがって，タンパク質の疎水領域との相互作用は弱く，吸着されたタンパク質を温和な条件で溶出できる．一般的に水溶性タンパク質の精製に用いられる．担体は界面活性剤を強く結合するため，膜タンパク質の精製にはあまり用いられない．高塩濃度下ではタンパク質の電荷が中和され，溶解度が低下し疎水性が増加するため，担体の疎水性リガンドに結合する．そのため，タンパク質を塩析する濃度以下の高塩濃度条件下でカラムへ吸着させる．したがって，硫安沈殿やイオン交換クロマトグラフィーの後に利用するのに適している．また，溶出液の塩濃度を低下させることによりタンパク質を溶出させる．異なる疎水性のリガンドを結合した担体が購入できるので，目的のタンパク質の精製に最も適した担体を選択する（表 3）．

## 6.f.6　アフィニティークロマトグラフィー

タンパク質は特定の物質と相互作用することによりその機能を発揮する．例えば，酵素は基質，生成物，補酵素，競争阻害剤およびアロステリック活性化剤などと，抗体は抗原とアフィニティー（親和力）により結合する．タンパク質のこの様な特性を精製に応用したのがアフィニティークロマトグラフィーである．アフィニティークロマトグラフィーでは，目的のタンパク質とアフィニティーをもつ物質をリガンドとして担体に結合させる（図 10）．リガンドを担体に化学的に結合させるために反応性官能基をもつスペーサーを導入した活性化型アフィニティー担体が市販されている．精製するタンパク質に

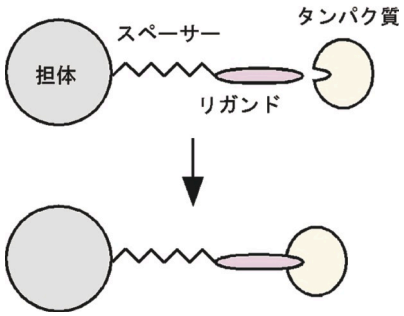



図 10：アフィニティークロマトグラフィーによるタンパク質分離の原理
担体にリガンドを結合させる．このとき 6-10 炭素原子を含むスペーサーを介在させて結合させることがある．吸着時の溶液は目的のタンパク質とリガンドの結合が最適になるように選択すると，タンパク質はカラムに吸着され，リガンドと親和性のないタンパク質はそのまま溶出される．溶出時には溶液の塩濃度を高くしたり，pH を変化させたりして，タンパクとリガンドの結合を解離させる．

よりリガンドや担体を適切に選択しなければならない．リガンドとして抗体を使用すると，抗原タンパク質を精製することができる．アガロース担体をCNBrで活性化して抗体を結合させる．カラムにタンパク質を吸着させるときは，温和な塩，中性pH条件下で行う．溶出には高塩や低pH，界面活性剤などの変性剤の添加，などの条件下で行う．

関連した機能や構造をもつタンパク質に共通した親和性を示すリガンドを利用して精製する方法もある．この様なリガンドを結合させたアフィニティークロマトグラフィー用担体が市販されている．*Staphylococcus aureus* より抽出したプロテインAは，ほ乳類のIgGのFc部分に結合する．このプロテインAを結合させた担体（Bio-Rad）はIgGを高純度に精製するために利用される．IMAC（Immobilized Metal ion Affinity Chromatography）は固定化金属アフィニティークロマトグラフィー（Metal Chelate Chromatograpy）とも呼ばれる．主に二価の金属イオン（$Cu^{2+}$, $Zn^{2+}$, $Hg^{2+}$, $Cd^{2+}$, $Co^{2+}$, $Ni^{2+}$, $Mn^{2+}$）を固定化する．リン酸化タンパク質やペプチドの精製には$Fe^{3+}$も使われるが，二酸化チタン（$TiO_2$）から作製されたTitansphere（GLサイエンス）が有効である．また，Ni-NTA（nickel-nitrilotriacetic acid）アフィニティークロマトグラフィーはリコンビナントHis-tagタンパク質の精製に利用される．リガンドはIDA（Iminodiacetic acid）で，ネイティブな条件でも変性条件でも精製できる．また，核酸関連物質を基質とする酵素などの精製に利用される色素結合型アフィニティークロマトグラフィー用担体が市販されている．その一つであるToyopearl AF-Red-650（東ソー）は担体にProcion Red HE-3B色素（Reactive Red 120）を共有結合させたゲルで，ヌクレオチドに依存した酵素，リポタンパク質などの精製に用いられる．

クラミドモナスの水溶性タンパク質のDEAEクロマトグラフィーによる分離により，低塩濃度の溶出液にFNRに富む画分が分離された（図5，レーン2〜5）．この画分には多くの水溶性タンパク質が含まれている．この画分をToyopearl AF-Red-650を用いたアフィニティークロマトグラフィーでさらにする例を示す（図11）．

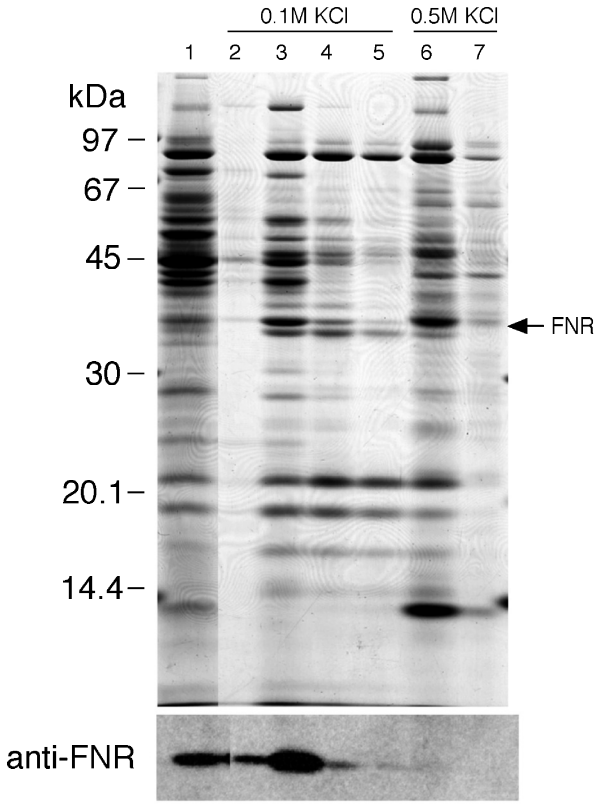



**図11：色素結合型アフィニティークロマトグラフィーによるFNRの精製**
緑藻クラミドモナスの水溶性タンパク質のうち，DEAEカラムのFNRを含む画分（レーン2〜5）を試料にした．カラムに試料を吸着させ，0.1 M KClを含む溶液で溶出させ4つに分画し（レーン2-5），さらに0.5 M KClを含む溶液で2つに分画した（レーン6-7）．FNR抗体を用いたウェスタン分析は，レーン3にFNRが溶出することを示す．

**［実験方法］**

1．1 mlのAF-Red 650 ML（東ソー）をキャップのできる小型のカラム（例えばBio-Rad社製のポリプレップエンプティーカラム）に充填する．
2．カラムを20 mM Tricine-NaOH pH 7.8で平衡化する．
3．カラムに試料を添加し，キャップをし，液漏れしないようにパラフィルムを巻く．
4．カラムを4 ℃でゆっくり回転させながら一晩放置し，FNRを吸着させる．
5．試料の吸着後，カラムをしばらく放置し担体を沈殿させる．
6．非吸着試料を溶出させる．
7．4 mlの20 mM Tricine-NaOH pH 7.8でカラムを洗う．
8．4 mlの20 mM Tricine-NaOH pH 7.8，0.1 M KClで溶出し，1 mlずつ分画する．
9．4 mlの20 mM Tricine-NaOH pH 7.8，0.5 M KClで溶出し，1 mlずつ分画する．
10．20 mM Tricine-NaOH pH 7.8，1 M KClでカラムを洗浄し，再生する．
11．20 mM Tricine-NaOH pH 7.8，1 M KCl，20%エ

タノールに置き換え，4 ℃でカラムを保存する．

図 11 に分離した画分のタンパク質組成を SDS-PAGE で，FNR の分離をウェスタン分析で解析した．本吸着条件では FNR は効率よくカラムに吸着した．0.1 M KCl 存在下では FNR は担体から遊離し，1 カラム容積の溶出後に検出される．0.5 M KCl 存在下では新たに多数のタンパク質が溶出されるが FNR は検出されない．この方法により FNR は純化されたと言えるが，このアフィニティー担体と親和性をもつタンパク質は少なからず存在するため，FNR に富む画分にもまだ多くのタンパク質が存在する．

## 6.f.7 おわりに

タンパク質の化学的および物理的性質の違いを利用して精製する様々なカラムクロマトグラフィーが開発されてきた．タンパク質には共通の特性があるので，1 回のクロマトグラフィーにより目的のタンパク質を完全に純化することは難しい．したがって，各クロマトグラフィーの原理と特性を理解して，複数の精製操作を効率的に組み合わせていかなければならない．目的のタンパク質の精製にアフィニティークロマトグラフィーが利用できる場合は，精製の最終段階に利用すると有効である．最近では，様々な種類のタグを融合したタンパク質を発現させる手法が開発され，極めて微量に発現するタンパク質の精製も可能になった．タンパク質の質量分析技術の進歩に伴い，カラムクロマトグラフィーによるタンパク質精製手法はこの後もますます重要になると考えられる．

# 6．タンパク質
## g．界面活性剤

小澤真一郎[1)]，高橋裕一郎[1)]

界面活性剤は光合成タンパク質の生化学的解析によく用いられる．電気泳動法による分析では，タンパク質の可溶化，変性，電荷の付与などに，膜タンパク質の精製・分析では，疎水性タンパク質の可溶化に使われる．本章では，一般的に使われる界面活性剤について紹介する．

## Detergents

Shin-ichiro Ozawa, Yuichiro Takahashi

Detergents are frequently used for biochemical analyses of photosynthetic proteins. For polyacrylamide gel electrophoresis, detergents are used to solubilize and/or denature proteins. For purification of membrane proteins, detergents are also required for solubilization of water-insoluble proteins. In this chapter, detergents that are frequently used in protein biochemistry are introduced.

### 6.g.1　界面活性剤の種類

界面活性剤（detergent）は，親水基と疎水基をもつ両親媒性分子（amphiphilic molecule）で，ミセルを形成することにより，疎水性分子を可溶化する作用をもつ．親水基に正もしくは負の電荷をもつイオン性界面活性剤（ionic detergent），正と負電荷の両方をもつ両性界面活性剤（zwitterionic detergent）と電荷をもたない非イオン性界面活性剤（nonionic detergent）がある．イオン性界面活性剤はタンパク質の変性作用が強く，非イオン性界面活性剤は変性作用が弱いと一般的に考えられているが，例外もある．イオン性界面活性剤を加えるとそのミセルを結合したタンパク質の電荷が増加し，電気泳動でタンパク質を分析するときの分離がよくなる．しかし，Isoelectric Focusing や，疎水性，ヒドロキシアパタイトおよびイオン交換クロマトグラフィーにはイオン性界面活性剤は適しない．

水溶液中での界面活性剤の濃度が，臨界ミセル濃度（CMC, critical micelle concentration）より高いと，界面活性剤は親水基を外側に，疎水基を内側にしたミセルを形成する．界面活性剤のミセルサイズが大きい，もしくは CMC が低いと，界面活性剤を透析により除去するのは難しくなる．可溶化した膜タンパク質の精製に用いる溶液には，可溶化状態を維持するために界面活性剤を加える必要がある．CMC は溶液の温度，イオン強度および pH により変化するので，溶液中には CMC より高めの界面活性剤を加える．光合成タンパク質の解析によく使われる界面活性剤のリスト（表 1）と分子構造（図 1）をまとめた．

### 6.g.2　タンパク質の分析に使われる界面活性剤

SDS は，ポリペプチドの分析によく使われる SDS-PAGE（6 a 章参照）において，分析するタンパク質を変性させるために使用される．親水基として負電荷の硫酸基をもち，変性したポリペプチドに負電荷を与える．したがって，SDS-PAGE では，ポリペプチドはそのサイズに依存した距離を泳動する．SDS はカリウムイオン存在下では不溶性の塩を形成するので，サンプル溶液にカリウムイオンが含まれないように注意する．

ウェスタン分析で疎水性タンパク質をゲルからフィルターへ電気泳動的にブロットするとき，ブロット溶液に SDS を加えることがある（6 h 章参照）．また，ウェスタン検出のときの非特異的な交差反応によるシグナルを減少させるとき，ハイブリダイズや洗浄する溶液に非イオン性界面活性剤の Tween20（polyoxyethylen (20) sorbitan monolaurate）を加える（6.h 章参照）．

膜タンパク質や多数のタンパク質から構成される複合体を非変性の状態で微量分析する手法として使われる Native Polyacrylamide Gel Electrophoresis（Native PAGE）には，様々な変法が報告されている．Green Polyacrylamide Gel Electrophoresis は，1964 年に Ogawa らにより報告された SDS-PAGE によるクロロ

1）岡山大学大学院自然科学研究科

**表 1**：光合成研究に使われる界面活性剤

| 界面活性剤 | アルキル基の炭素数 | タイプ | 分子量 | CMC(mM) | 構造 |
|---|---|---|---|---|---|
| n-Decyl-β-D-maltoside | 10 | 非イオン性 | 482.6 | 1.8 | 10 |
| n-Undecyl-β-D-maltoside | 11 | 非イオン性 | 512.7 | 0.21 | 10 |
| n-Tridecyl-β-D-maltoside | 13 | 非イオン性 | 524.6 | 0.033 | 10 |
| n-Tetradecyl-β-D-maltoside(DM, DDM) | 14 | 非イオン性 | 538.6 | 0.01 | 10 |
| n-Dodecyl-β-D-thiomaltoside | 12 | 非イオン性 | 526.6 | 0.05 | 9 |
| n-Octyl-β-D-glucoside | 8 | 非イオン性 | 292.4 | 18–20 | 8 |
| Deoxycholate, sodium salt | | 負イオン性 | 414.6 | 2〜6 | 2 |
| Lauryldimethylamine-oxide(LDAO) | | 両性(pH＞7),正イオン性(低 pH) | 229.41 | 0.14 | 6 |
| Sodium dodecyl sulfate(SDS) | 12 | 負イオン性 | 288.38 | 2.6 | 1 |
| Litium dodecyl sulfate(LDS) | 12 | 負イオン性 | | | |
| TRITON X-100 | | 非イオン性 | | 0.23 | 3 |
| TWEEN 20 | | 非イオン性 | 1228(平均) | 0.059 | 4 |
| Digitonin | | 非イオン性 | 1229.3 | 0.5 | 5 |
| Methyyl-6-*O*-(N-heptylcarbamoyl)-α-D-glucopyranoside (HECAMEG) | 7 | 非イオン性 | 335.4 | 19.5 | 7 |

フィルタンパク質の分離法である[1]．チラコイド膜のSDS による可溶化条件を温和にし（チラコイド膜濃度を高く，SDS 濃度を低く，処理温度を低温に），電気泳動を低温で行うと，系 I や LHCII などのクロロフィルタンパク質がポリアクリルアミドゲル上に CPI や CPII として分離される．低温でチラコイド膜の可溶化を行うとき，SDS が析出する場合は，ナトリウム塩の代わりに低温での溶解度が高いリチウム塩の LDS（litium dodecyl sulfate）を使用することもある．Colorless Native Polyacrylamide Gel Electrophoresis（CN-PAGE）は，非イオン性界面活性剤で可溶化した膜タンパク質複合体を分離する方法である[2]．タンパク質は変性されずに，タンパク質のもつ電荷（負電荷）で電気泳動される．しかし，大きな複合体は泳動度が小さいため，分離がよくない．Blue Native Polyacrylamide Gel Electrophoresis（BN-PAGE）は，CN-PAGE の欠点を補うため，負電荷をもつ Coomasie Blue R-250 色素をタンパク質に結合させて電気泳動を行う（6.b 章参照）[3]．その結果，タンパク質の分離が大幅に改善される．しかし，分離された膜タンパク質に青い色素が結合しているため，吸収スペクトルや活性などの分析には不適切なことがある．この方法は，SDS-PAGE と組み合わせた二次元電気泳動により，分離された複合体のサブユニット組成の分析に優れている．High Resolution Clear Native Electrophoresis（HR-CNE）は，非イオン性界面活性剤の代わりに，負の電荷をもつがタンパク質の変成作用が強くないデオキシコール酸塩（deoxy cholate）を用いる[4]．

## 6.g.3 膜タンパク質の可溶化に使われる界面活性剤

水溶性タンパク質と異なり，膜タンパク質の精製に可溶化は必須である．タンパク質の変性を最小限に抑え，かつ高い効率で可溶化しなければならない．イオン交換クロマトグラフィーでの精製には，イオン性界面活性剤は使用できない．したがって，膜タンパク質の精製には，非イオン性界面活性剤が一般的に使用される．

光合成に関与する膜タンパク質は数多く知られているが，最もよく研究されてきたのは，クロロフィルタンパク複合体やシトクロム $b_6f$ 複合体などである．用いる光合成生物や膜タンパク質の種類により，効果的な界面活性剤は異なることが多い．これまでに可溶化効率が高く，かつタンパク質の変性作用の少ない非イオン性界面活性剤が数多く開発されてきた．

ジギトニン（digitonin）は温和な非イオン性界面活性剤で，葉緑体の膜断片やクロロフィルタンパク複合体の単離に使われる．光化学系 I と II を生化学的に分離できることを示した実験に使われた[5]．低濃度のジギトニンでチラコイド膜を処理すると，チラコイド膜のスタックした領域（グラナチラコイド）とスタックしていない領域（ストロマチラコイド）の境界で膜が切断される[5]．その結果，重い画分である，光化学系 II に富むグラナチラコイドと，軽い画分である光化学系 I に富むストロマチラコイドが，分画遠心により分離された．より高濃度のジギトニンでチラコイド膜を処理すると，クロロフィルタンパク質が可溶化される[6]．しかし，チラコイド膜を完全に可溶化する効率は高くなく，最近ではクロロフィルタンパク質の可溶化にはあまり使われない．

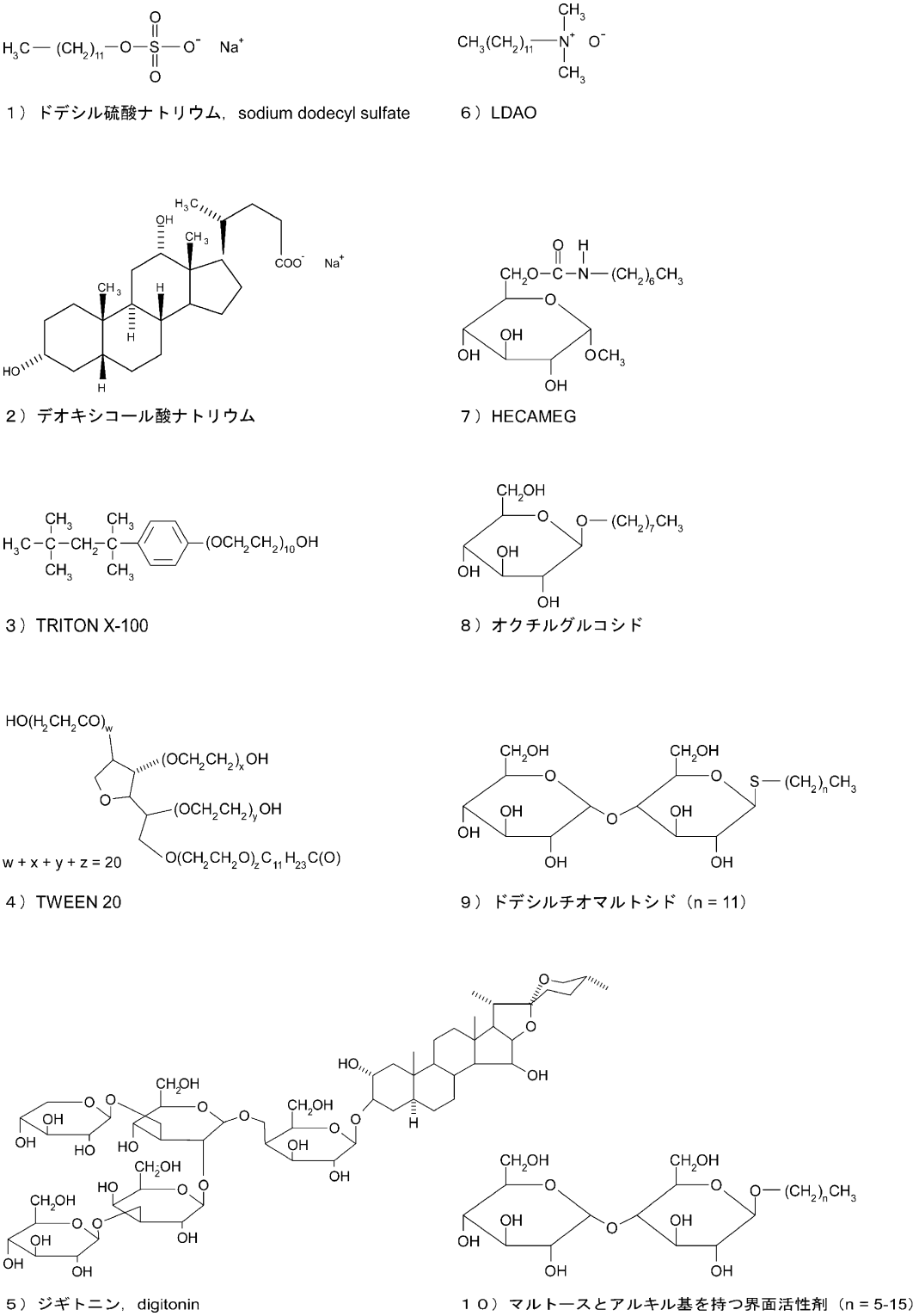



図1：界面活性剤の分子構造

非イオン性界面活性剤は高価なものが多いが，安価である．TRITON X-100（$\alpha$-[4-(1, 1, 3, 3-tetramethylbutyl) phenyl]-$\omega$-hydroxy-poly（oxy-1, 2-ethanediyl））はポリオキシエチレン基（-O-$CH_2$-$CH_2$-）$_n$-OH を含み，チラコイドの膜断片やクロロフィルタンパク複合体の単離に使われる．チラコイド膜を低濃度で処理すると，酸素発生活性をもつチラコイド膜のスタックした領域（光化学系II酸素発生標品）が分画遠心により単離される[7,8]．より

高濃度でチラコイド膜を可溶化すると，クロロフィルタンパク質が可溶化される．この界面活性剤を使用すると，クロロフィルタンパク質に結合するクロロフィルの吸収スペクトルが変化することがある．

LDAO（lauryldimethylamine-oxide）とオクチルグルコシド（n-octyl-$\beta$-D-glucoside）は，光合成細菌の反応中心や酸素発生活性を保持した光化学系IIの単離に有効である（4b章）．可溶化度を最適化すると，シアノバクテリアのチラコイド膜から，光化学系IIを特異的に可溶化できる．溶液のpHが7以上ではLDAOは両性界面活性剤であるが，酸性pHでは正の電荷をもつイオン性界面活性剤となる（図1）．一方，HECAMEGは，濃度を最適化するとシトクロム $b_6f$ 複合体を特異的に可溶化できる[9]．活性の高いシトクロム $b_6f$ 複合体を高純度に精製するのに使われる．

親水基に糖鎖（グルコースおよびマルトース）と疎水基にアルキル鎖をもつ界面活性剤は，膜タンパク質の可溶化に有効である．糖鎖がグルコースでアルキル基の炭素数が6～12の界面活性剤が入手できる（Anatrace社；http://www.anatrace.com/）．炭素数が少ないもの（7以下）はCMCが高く，炭素数が多いもの（10以上）は水に溶けにくいため，膜タンパク質の可溶化には不向きである．この系列の界面活性剤の中で最もよく利用されるのは，炭素数8のアルキル基をもつオクチルグルコシドである．また，糖鎖がマルトースでアルキル基の炭素数が6と8～16の界面活性剤が入手できる．グルコースに比べマルトースをもつ界面活性剤は，アルキル基の炭素数が多くても水への溶解度が高く，さらにタンパク質の構造や機能に対して温和であるため，膜タンパク質の解析には適している．図2に，アルキル基の炭素数11～14の界面活性剤での可溶化とクロロフィルタンパク質のショ糖密度勾配超遠心法による分離パターンを示す．炭素数が11と12のundecyl-maltosideとdodecyl-maltosideの可溶化効率と分離パターンはよく似ている．炭素数13のtridecyl-maltosideは，クロロフィルタンパク質の解離において少し温和である．炭素数14のtetradecyl-maltosideの可溶化効率は悪く，クロロフィルタンパク質の分離もやや不明瞭である．dodecyl-maltosideは，チラコイド膜の可溶化の効率と再現性が高く，光化学系I複合体や光化学系IIコア複合体の可溶化に最もよく使われる（4a章参照）[10–14]．この界面活性剤を使って単離された標品の電子伝達活性も高く保たれ，クロロフィルの吸収スペクトルの保存もよいという利点がある．結晶化のための光化学系複合体標品の精製でも優れた成果が得られている．植物の光化学系I複合体の結晶化では，dodecyl-maltosideを用いて精製した後に界面活性剤をdodecyl-thiomaltosideに置き換えて成功した例がある[14]．

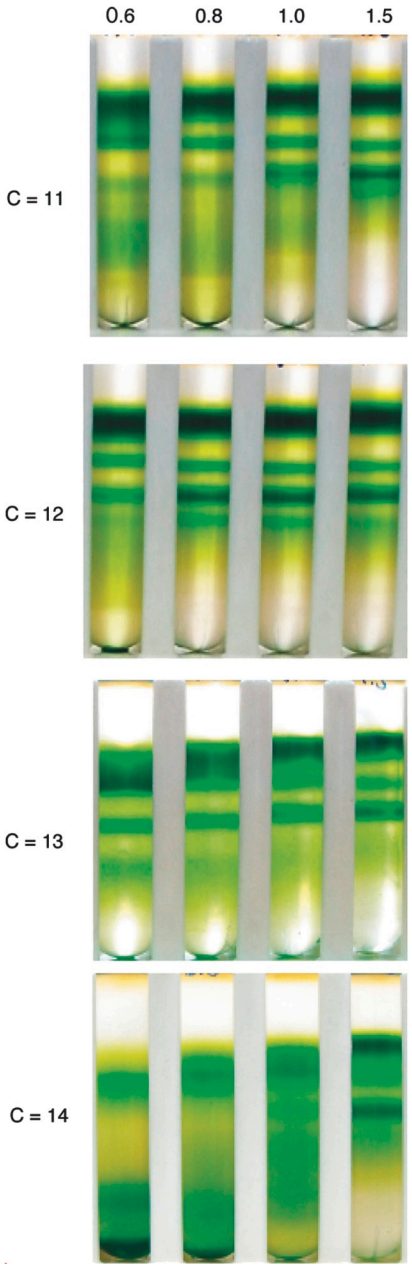



**図2**：親水基にマルトースを含む界面活性剤で可溶化したチラコイド膜の分離
炭素数が異なるアルキル基をもつ界面活性剤（C＝11，12，13，14はUndecyl-maltoside，Dodecyl-maltoside，Tridecyl-maltoside，Tetradecyl-maltosideに相当する）で可溶化した時のクロロフィルタンパク質の分離パターンへの影響．チラコイド膜を異なる濃度の界面活性剤で可溶化し，ショ糖密度勾配超遠心法でクロロフィルタンパク質を分離した．

## 6.g.4 おわりに

界面活性剤はタンパク質の分析や膜タンパク質の可溶化に必須であるが，用いる光合成生物や対象とするタンパク質により，最適な界面活性剤が異なることが，これまでの研究で明らかにされている．しかし，すべての種類の界面活性剤が，あらゆる光合成生物や膜タンパク質に系統的に試されてきた訳ではない．したがって，より高い純度と活性をもつ膜タンパク質を単離・精製するには，界面活性剤の選択や可溶化条件の最適化が重要である．また，構造解析のための膜タンパク質の結晶化が盛んに行われるようになってきた．この場合，精製された膜タンパク質の純度や均一性が重要である．さらに用いた界面活性剤の結晶化に与える影響も無視できないため，界面活性剤は慎重に選択する必要がある．最後に，界面活性剤でタンパク質を可溶化すると，プロテアーゼによる分解を受けやすくなる．この場合，プロテアーゼ阻害剤を溶液に添加する必要がある．金属プロテアーゼに対しては，0.5〜5 mM ethylenediaminetetraacetic acid(EDTA)，セリンプロテアーゼには1〜2 mM phenylmethanesulfonyl fluoride(PMSF) や2〜5 mM 6-aminocaproic aid が安価でよく使われる．

## 文献


1）T. Ogawa, F. Obata, & K. Shibata, Biochim Biophys Acta **112** (1966) P.223.
2）H. Schagger, W. A. Cramer, & G. von Jagow, Anal Biochem **217** (1994) P.220.
3）H. Schagger & G. von Jagow, Anal Biochem **199** (1991) P.223.
4）I. Wittig, M. Karas, & H. Schagger, Mol Cell Proteomics **6** (2007) P.1215.
5）N. K. Boardman & J. M. Anderson, Nature **203** (1964) P.166.
6）K. Satoh, Biochim Biophys Acta **546** (1979) P.84.
7）D. A. Berthold, G. T. Babcock, & C. F. Yocum, FEBS Letters **134** (1981) P.231.
8）T. Kuwabara & N. Murata, Plant and Cell Physiology **23** (1982) P.533.
9）Y. Pierre, C. Breyton, D. Kramer, & J. L. Popot, J Biol Chem **270** (1995) P.29342.
10）N. Kamiya & J. R. Shen, Proc Natl Acad Sci U S A **100** (2003) P.98.
11）S. Iwata & J. Barber, Curr Opin Struct Biol **14** (2004) P.447.
12）P. Jordan, P. Fromme, H. T. Witt, O. Klukas, W. Saenger, & N. Krauss, Nature **411** (2001) P.909.
13）B. Loll, J. Kern, W. Saenger, A. Zouni, & J. Biesiadka, Nature **438** (2005) P.1040.
14）A. Amunts, O. Drory, & N. Nelson, Nature **447** (2007) P.58.

# 6．タンパク質
## h．ウェスタン分析

大西　岳人[1)]，高橋裕一郎[1)]

タンパク質を特異的に検出するウェスタン分析は，化学発光を用いる検出法により微量のタンパク質でも強いシグナルが得られるため，強力な実験手法である．本章では，ウェスタン分析の実験手法と抗体の作製法について紹介する．

## Western blotting

Takahito Onishi and Yuichiro Takahashi

Western blotting is a powerful tool for detecting with high sensitivity a specific protein resolved by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. In this chapter, procedures for western blotting using enhanced chemiluminescence and for generation of antibodies in rabbits are described.

### 6.h.1　ウェスタン分析とは

組織，細胞および葉緑体などのタンパク質を可溶化し，SDS-PAGE で分析すると，多数のポリペプチドが分離される．目的のタンパク質が多量であれば，その存在を確認することは難しくないが，少量であると検出は容易でない．また，細胞もしくは葉緑体のタンパク質の蓄積量の変化を分析する場合，特定のタンパク質を特異的かつ定量的に検出することが必要となる．目的のタンパク質に対する抗体があれば，ウェスタン分析は特異的で，高感度で，信頼性の高い分析法である．

ウェスタン分析法では，SDS-PAGE で分離したポリペプチドを，ニトロセルロース（NC）や polyvinylidene difluoride（PVDF）膜に電気泳動的に転写するブロッティングを行う．次に，膜上に結合した目的のポリペプチドとそれに対する抗体（一次抗体）を抗原抗体反応で結合させる．次に一次抗体を結合したポリペプチドを検出するため，一次抗体に対する抗体（二次抗体）を結合させる．化学発光法（ECL, enhanced chemiluminescence）では，二次抗体に結合した HRP（horseradish peroxidase）活性を利用し，目的のポリペプチドのバンドを高い感度で検出する[1)]（図 1）．化学発光はＸ線フィルムもしくは CCD カメラに露光させて検出・記録する．

ウェスタン分析には，SDS-PAGE，ブロッティング，および化学発光を検出する装置が必要である．二次抗体は市販されている（GE ヘルスケアバイオサンエンス，Anti Rabbit IgG, HRP-linked whole Antibody）．したがって一次抗体を入手することがウェスタン分析には必須である．可能であれば他の研究者から譲り受けたりする．最近では，商業的に購入可能な光合成タンパク質に対する抗体の種類も増えている（Agrisera 社，http://www.agrisera.se/）．新規のタンパク質に対する抗体が必要な場合，費用がかかるが業者に抗体作製を委託することも可能である．費用を節約したい場合，ウサギなどを飼育して自分で作製する．この場合，動物を飼育する施設が必要で，動物の世話も行わなければならず，労力がかかることを覚悟しなければならない．また，目的のタンパク質にタグ（HA や FLAG など）を融合して発現させた遺伝子組み換え植物を作製し，タグに対する抗体を購入して使用する方法もある．

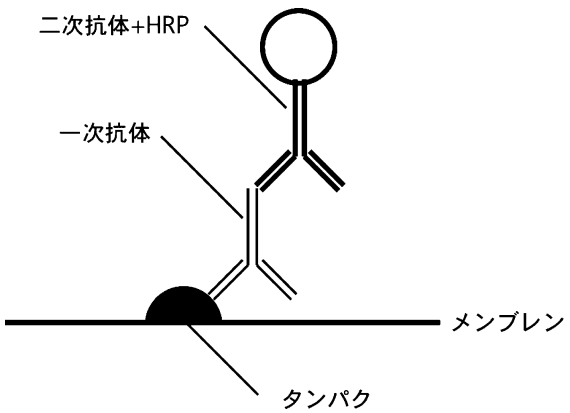



図 1：ウェスタン分析におけるシグナルの検出

1）岡山大学大学院自然科学研究科

[実験方法]

用意する試薬

ブロッティングバッファー（1 L）；3.03 g Tris base，20%（v/v）メタノール．

5.25 g ε-アミノカプロン酸を加えることもある．

10 倍ポンソ溶液（100 mL）；2 g Ponceau S，20 g trichloro acetic acid，20 g sulfosalycilic acid，水で 10 倍に希釈して使用．

10 倍 TBS-T（1 L）；24.3 g Tris-base，80 g NaCl，20%（w/v）Tween20，HCl で pH 7.6 にあわせる（Tween 20 は必ずしも必要ないが，検出時のバックグランドを低くする効果がある）．10 倍に希釈して使用．

化学発光用検出試薬；化学発光の持続時間が長い，感度が高いなどの市販の検出試薬を使用する．一次抗体の力価が高い場合は，自分で調製した検出試薬でも検出はうまくいく．

A液　14 mg p-coumaric acid/ml DMSO 400 μl に分注し，−20 度で保存

B液　44 mg Luminol/ml DMSO 900 μl に分注し，−20 度で保存

I液　90 ml Tris-HCl，pH 8.5 に 30%$H_2O_2$ 溶液 50 μl とA液 400 μl を混ぜる．

II液　90 ml Tris-HCl，pH 8.5 にB液 900 μl を混ぜる．

検出直前にI液とII液を1：1に混合し使用する．

I液とII液は1週間くらい冷蔵保存できる．Luminol は不安定なので，鮮やかな黄色の粉末が，長期間保存することにより褐色になると，シグナルの検出感度が低下することがある．

電気泳動的ブロッティング

ポリペプチドを分離する SDS-PAGE は 3 章 6.a を参照する．泳動が終了した後，ゲルから分離したポリペプチドを NC 膜や PVDF 膜に電気泳動的にブロッティングする装置には，ウェット式とセミドライ式がある．ウェット式では，ブロット槽中のブロッティングバッファーにゲルと膜を完全に浸けた状態でブロットを行う．高電流を発生するブロット用電源や大量のブロッティングバッファーが必要である．熱がかなり発生するため，ブロット中はバッファーを冷却する．ここでは主流になりつつあるセミドライ式でブロットする法を述べる．セミドライ式はブロッティングバッファーが少量ですみ，電源も電気泳動用のものが使用できる．熱の発生も少ないので，冷却する必要はなく室温でできる．ここでは，NC 膜を使用した方法を述べる．0.44 μm と 0.2 μm のポアサイズの NC 膜が販売されているが，通常は価格の安い 0.44 μm の膜を用いる．10 kDa 以下の低分子タンパクを検出するときには，0.2 μm の膜を使用するとシグナル強度が強くなることがある．PVDF 膜は，特に低分子タンパクの保持力が若干高いようである．特にシグナルが弱いときに使用を検討したらよい．NC 膜と異なり，メタノールに浸透させる前処理が必要となる．

1．SDS-PAGE 後，ゲルをゲル板からはがし，ブロッティングバッファー中で 10−30 分間振とうし，バッファーの置き換えを行う．この操作は省略して，直接ブロッティンを行ってもよい．しかし，ゲルが Tricine バッファーまたは高濃度の尿素を含むと，ブロッティング時により多くの熱が発生する．温度が上昇するとゲルが伸びるので，特に低分子量のポリペプチドのブロットの歪みが無視できなくなる．

2．厚さ 1 mm のろ紙 6 枚（アドバンテック，クロマトグラフィー用ろ紙 No.590，厚さ 0.93 mm），NC 膜 1 枚をブロッティングバッファーに浸す．ブロッティング装置の下側の電極が正の場合，バッファーに浸したろ紙を 3 枚重ね，次に NC 膜，ゲルの順番で重ねる（下側の電極が負の場合は，NC 膜とゲルの順番は逆にする）．さらにゲルの上にバッファーに浸したろ紙を 3 枚重ねる．メスピペットや長めの試験管を転がして，メンブレンとゲルの間の気泡を取り除く．（図 2）

3．1 mm のゲル（15 cm x 15 cm）なら 300 mA 定電流で 1 時間（300 mAh），電気泳動的にブロットする．高分子のポリペプチド（80 kDa 以上）はブロットされにくいので，電気泳動時のゲル濃度を低くするか，ブロット時間を長くする．ブロット後のゲルを染色すれば，どれくらいポリペプチドがブロットされたかを確かめ

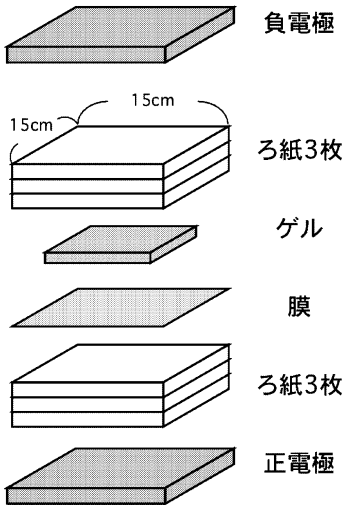



図 2：セミドライタイプのウェスタンブロッティング

ることができる．電流を 300 mA 以上にすると熱の発生が無視できなくなる．2 mm のゲルの場合は 2 倍の時間ブロットするが，ゲルシステムにより熱の発生が多い場合は，電流を下げて長い時間ブロットする（例えば 150 mA で 4 時間）．

4．ブロット後，濃縮ゲルのウェルの位置を基にして各レーンの位置をマークする．NC 膜を純水で洗い，ポンソ溶液に浸して 2 分間染色する．

5．NC 膜を水で洗い脱色する．染色された分子量マーカーの位置をマークする．

シグナルの検出

1．5%(w/v)スキムミルクを溶かした TBS-T 中で NC 膜を 30–60 分振とうして，ブロッキングする．染色されたバンドはこの操作中に脱色する．

2．ブロッキング後，TBS-T で 5 分間 2 回洗う．

3．5%(w/v) スキムミルクを溶かした TBS-T で希釈した一次抗体溶液に NC 膜を浸し，60 分振とうする．

4．NC 膜を TBS-T で 5 分間 2–3 回洗う．

5．二次抗体を TBS-T で希釈した溶液に NC 膜を浸し，20–40 分振とうする．

6．NC 膜を TBS-T 溶液で 5 分間 3 回洗う．

7．NC 膜を検出試薬に 1 分間浸す．

8．NC 膜をビニル袋に入れ，ポリシーラーでシールし，液体が外にもれないようにする．

9．NC 膜をX線フィルムにコンタクトさせ，シグナルを検出する．一般的に検出時間は 30 秒–5 分間である．もしくは，CCD カメラ撮影装置でシグナルを検出する．

## 6.h.2　ウェスタン分析の実験条件の検討項目

検出するタンパク質により，シグナルの検出が難しい場合があるので，実験条件の検討を行う必要がある．

1．SDS-PAGE の最適化；疎水性タンパク質を分離する場合，タンパク質の可溶化，分離ゲルの組成などを最適化しないと，バンドが不均一に広がり，シグナルがうまく検出できないことがある．例えば，6 M 程度の尿素を分離ゲルに加えると改善することがある．また，10 kDa 以下の小型のサブユニットを分離するときには，低分子ポリペプチド用の泳動システムを選択する（3 章 6.a 参照）．

2．ブロッティング条件；疎水性タンパクをブロットする時は，ブロッティングバッファー（1 L）；3.03 g Tris base，14.4 g glycine，0.5 g SDS，20%(v/v)メタノールを用いると効率よくブロットされる．また，ブロットは，目的のポリペプチドの分子量と分離に用いるゲルのかたさにより，最適化する必要がある．ここで述べた標準条件では，90 kDa 以上のポリペプチドのブロット効率は低い．また，SDS を加えたり，ブロットを長くしたりすると，小型のポリペプチドが膜を通り抜けることがあるので注意しなければならない．

3．シグナルの弱い時；目的のポリペプチドの量が少ない時は，ブロッキングと一次抗体溶液のスキムミルク濃度を下げる（0.5%程度）．スキムミルク濃度が高すぎると，目的のポリペプチドが覆われてしまうことがある．

4．定量的なシグナル検出；一次と二次抗体の濃度設定が重要である（図 3）．抗体濃度が高すぎるとバックグランドが高くなり，非特異的な交差反応によるシグナルが強くなることがある．また，一次抗体や二次抗体を結合させた後の膜の洗い条件を強くすると（溶液体積を多くしたり，振とう時間を長くしたりする），バックグランドや非特異的なシグナルが弱くなる．

5．抗体濃度の設定法；一般的には，一次抗体の力価は大きく異なるので，それぞれの抗体について，最適な希釈度を決める．最適化することにより，力価の低い，もしくは非特異的な交差反応がある一次抗体を用いても，きれいなシグナルが得られることがある．標準的な力価の抗体の場合，二次抗体の希釈度は標準に設定し(例えば 10000 倍)，一次抗体を 500，1000，2000 倍に希釈して検出する．最適と判断された一次抗体の希釈条件で，次に二次抗体の希釈を変化させて検出する（この場合 5000，10000，20000 倍）（図 3）．市販の二次抗体もロットにより力価が変わるので注意する．

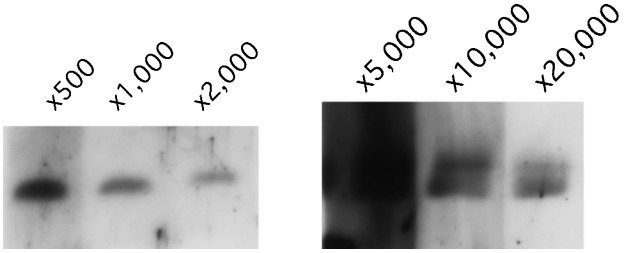



**図 3**：左；一次抗体の濃度のシグナルへの影響．二次抗体の濃度は一定である．一次抗体 500 倍希釈では少しバックグランドが高い．2000 倍希釈ではシグナルが弱くなる．
右；二次抗体濃度のシグナルへの影響．一次抗体の濃度は一定にし，二次抗体の濃度を変えた．二次抗体 5000 倍希釈では，バックグランドが高い．20000 倍希釈でも強いシグナルが得られる．

## 6.h.3　抗体の作製

抗体はウェスタン分析の他にも免疫沈降，免疫染色などの実験に使われる．ここでは，最もよく使用されるウサギのポリクローナル抗体を自分で作製する方法について紹介する．

2週間ごとに4回ウサギを免疫すると，抗体ができるまで少なくとも2ヶ月かかる．抗体価をチェックするため，3回目以降の免疫の1週後に試採血し，ウェスタン分析でシグナルの様子を調べる．抗体価の上昇が頭打ちになれば全採血する．場合によっては，さらに免疫を繰り返さなければならないが，10回程度行っても効果がないときは，必要な抗原の量にも限りがあるので，あきらめることが多い．

### 6.h.3.1　抗原の作製

一般に用いられる方法を述べるが，それぞれに利点と欠点があるので，研究目的に応じて選択する．

#### a）大量発現

目的のタンパク質の全長もしくは部分配列を大腸菌に大量発現させる．大量発現したタンパク質が不溶性であると，精製は容易でない．封入体（inclusion body）を単離してから精製することもある[2]．不溶性であってもSDS-PAGEで分離し，ゲルを切り出して抗原として使用できる．タグを融合したタンパク質を発現すれば，アフィニティーカラムクロマトグラフィーで精製できる．

#### b）合成オリゴペプチド

業者に委託してオリゴペプチドを合成してもらう．特異性が高い抗体を得ることができるが，抗体の力価は上がりにくいことがある．合成オリゴペプチドは，目的のタンパクの配列の中から，10-15アミノ酸配列を選ぶ．このとき，キャリアタンパクのKeyhole Limpet Hemocyanin（KLH）[3]をマレイミドベンゾイルオキシコハク酸イミド（MBS）で化学架橋させるため[4]，N末端にシステインを加える．オリゴペプチド溶液（100-200 $\mu$g/ml）は1 mlずつクライオチューブに分注し，冷凍保存する．1回の免疫注射に必要なタンパクは100-200 $\mu$gである．

#### c）生体から精製

SDS-PAGEで分離した後，CBBで染色可能な濃度のタンパク質が十分量あれば，精製して抗原として使用できる．タンパク質の全長配列に対する抗体であるので高い抗体力価が得られる可能性が高い．しかし，同サイズの他のタンパクの混入を許すので，ウェスタン分析による検出の際には交差反応によるシグナルが生じることもある．また，ホモロジーの高い他のタンパクとも交差反応する可能性があるので，注意が必要である．

サンプルを調整用電気泳動で分離しCBBで染色し，目的のタンパクのバンドを切り出す．切り出したゲルを破砕してそのままウサギに免疫すると，力価の高い抗体ができやすいと言われている．しかし，破砕したゲルは粘性が高く，注射しにくい欠点がある．切り出したゲルからポリペプチドを電気泳動的に抽出して抗原に使用してもよい．

### 6.h.3.2　ウサギ

抗体のできやすさは，ウサギの個体差が大きいので，2 kg程度の日本白色種ウサギ（Japanese White）オスを2匹使用する．ウサギは購入後，環境に慣れさせるために初回の免疫の1週間程前からケージで飼育する．3-4ヶ月の飼育期間にほぼ2倍の体重に生長する．飼育にはウサギ用のケージを使い（図4），汚物の掃除が便利なようにケージの底に新聞紙を6枚くらい敷く．1日に1度，ウサギ用飼料を1合と水の補給を行い，新聞紙を交換する．冬場ならエサ以外は2日に1度でもよい．なお動物実験は所属機関の動物実験規則・指針に従って実施する．

### 6.h.3.3　採血と血清の調整

免疫前チェック採血および3回目以降の免疫1週間後にウサギの耳の静脈から採血する．慣れるまでは，2人で作業するとよい．

1．ウサギが舌を噛まないように固定器に入れる（図5）．
2．ウサギの耳を軽く叩いたり，マッサージしたりして血行を良くし，採血しやすくする．血管が拡張すると耳が赤くなるのでよく分かる．冬場は使い捨てカイロでウサギの耳を暖めたり，事前にウサギを運動させたりするとよい．
3．70%エタノールを含んだ脱脂綿で血管の周囲を消毒

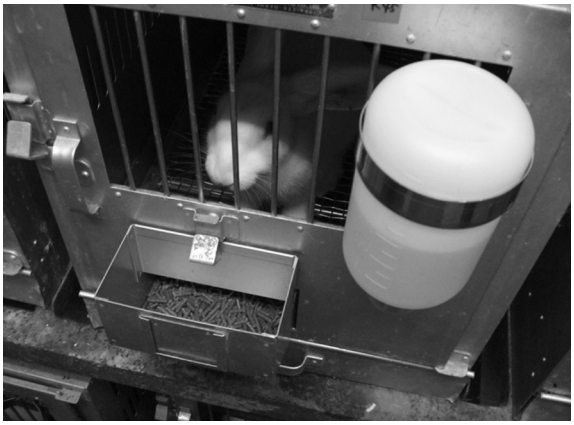


**図4**：ウサギのケージ．ウサギの前にエサ箱，白い入れ物は給水器．

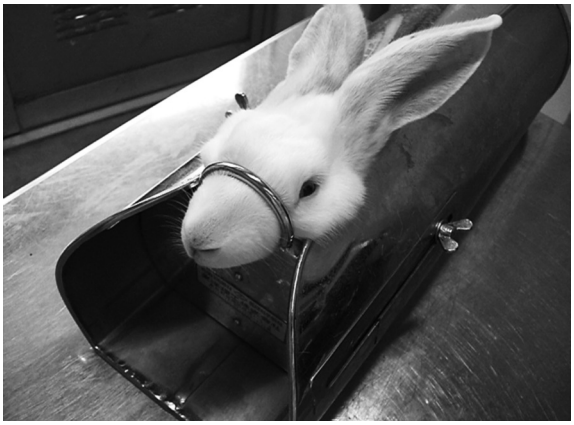


図5：固定器に入れたウサギ

する．

4．2 ml シリンジと 26 G x 1/2（0.45 x 13 mm）の針を用意する．耳の静脈に血流と逆向きに針を刺して少なくとも 1 ml 採血する（図 6）．

5．採血後，乾いた脱脂綿で押さえながら針を抜き，出血を抑える．

6．注射器から針を外し，マイクロチューブに血液を入れる．

7．血液を室温で 1 時間，その後 4 ℃で一晩静置し，血餅を形成させる．

8．ピペットで血清を新しいマイクロチューブへ移す．

9．マイクロ遠心機で 15,000 rpm で 5 分間遠心し血餅を完全に除く．

10．血清に 1 mM になるよう $NaN_3$ を加え，4 ℃で保存する．

### 6.h.3.4　抗原注射液の調製

抗原とアジュバントを 1 mL ずつ混合しエマルション（乳濁液）を形成させ，抗原注射液とする[5]．初回の免疫には加熱滅菌した結核菌体を含み，強力な免疫反応を引き起こす Freund's Complete Adjuvant を使用する．その後の免疫には Freund's Incomplete Adjuvant を使用する．シリンジ中に残るなどして 0.2-0.5 ml ほどロスが出てくるので，少し多めに調製してもよい．

**[抗原溶液の調整方法]**

**抗原が溶液の場合**

1．連結部があるガラス製の 2 ml シリンジを 2 つ用意する．一方のシリンジには 19 G の針を，他方には連結管をつける．

2．針の付いたシリンジでアジュバントを 1-1.2 ml 吸い取り，空気を抜いてから続けて抗原溶液を 1-1.2 ml 吸い取る．

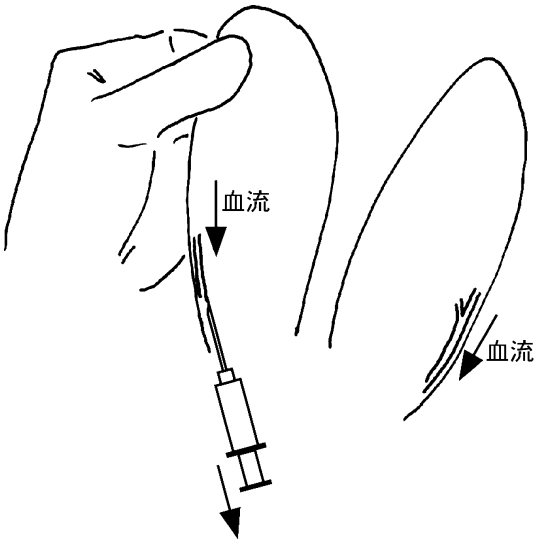





図6：採血の様子．血流に向かって針を刺す．

3．針を外し，他方のシリンジの連結管と接続する．

4．一方のシリンジの抗原溶液を他方のシリンジへピストンを押して移動する．

5．いったん連結管を外し，抗原溶液の入ったシリンジから空気を除く．

6．再度連結管に接続し，2 つのシリンジのピストンを左右交互に押し，エマルションを形成させる．

7．エマルションが十分に形成され，ピストンが固くなるまで数分間混合を続ける．

8．注射器に 19 G の針をつけ，免疫注射する．

**抗原を含んだゲルを使用する場合**

抗原を含むポリアクリルアミドゲルをアジュバントと混合して抗原注射液を調製する．

1　2 mm 厚のゲルから切り出したタンパク質を含むゲル片（2 mm x 2 mm x 150 mm）2 つを乳鉢に入れる．

2　液体窒素を加えゲルを凍結し，乳棒で粉末になるま

で砕く．
3　粉末が溶けるとペースト状になるので，マイクロスパーテルでシリンジに移す．
4　シリンジにピストンを入れ，連結管をつける．
5　もう一方のシリンジに 19 Gの針をつけ，アジュバンドを 1–1.2 ml 加え，シリンジを押して空気を抜く．
6　2つのシリンジを連結管に接続し，ピストンを左右交互に押し，エマルションを形成する．
7　エマルションが十分に形成され，ピストンが固くなるまで混合を続ける．
8　注射器に 19 Gの針をつけ，免疫注射する．

### 6.h.3.5　免疫

ウサギの皮下に抗原溶液を注射する．初回の注射には Freund's Complete Adjuvant を使用しているため，自分の手を刺さないよう注意する．背中に注射する方法もあるが，ここではリンパ節の近い四肢の付け根，脇腹部に注射する方法を紹介する．

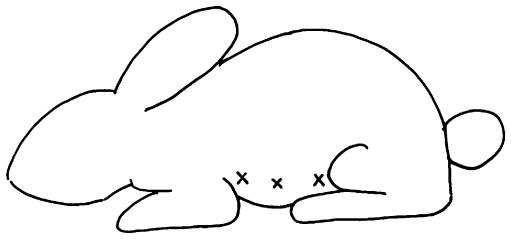
1．ウサギは足が滑ると暴れるので，作業台にタオルを敷くとよい．
2．ウサギを作業台に乗せ，目隠しをして落ち着かせる．目隠しの上から頭を押さえ，もう一方の手でウサギの腰を押さえて動かないようにする．
3．ウサギの脇腹の皮膚を引っぱり，70%エタノールを含む脱脂綿で消毒する．
4．毛を湿らすと，皮膚が見えてくるので，針をウサギの身体に平行に刺す（図 7）．針の先が体腔で止まるようにし，0.3–0.4 ml 注射する．これを左右の脇腹でそれぞれ 3 カ所注射する．出血したら，脱脂綿で押さえて止血する．

### 6.h.3.6　抗体価のチェック

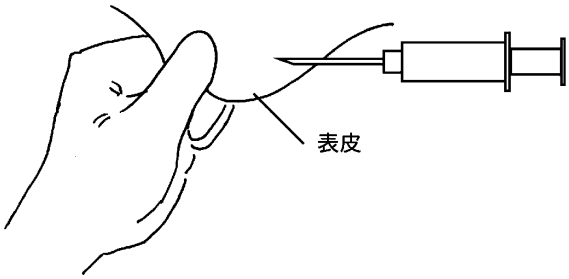
抗体価は免疫回数を重ねるにつれて高くなるが，ピークに達したのちに低下することもある．最も抗体価が高い時期に全採血を行うために，3 回目の免疫からは，免疫 1 週間後に毎回試採血し，抗体価の変化をチェックする．主にウェスタン分析に抗体を使用するなら，ウェスタン分析で抗体価をチェックするのがよい（図 8）．オリゴペプチドを抗原とした場合，オリゴペプチド溶液の希釈溶液を NC 膜上に 10 $\mu$l 滴下しスポットをつくる．この膜を使って，1000 倍希釈した血清と反応させ，ウェスタン分析と同じ方法でシグナルを検出すると抗体価の上昇の様子がわかる．

### 6.h.3.7　全採血

十分に抗体価が上がった段階で全採血を行う．50–150 ml 採血できる．耳からの採血でも，10–20 ml の採血は可能である．全採血ではウサギに麻酔をかけ，喉を開いて



腹部左右 3 箇所ずつ抗原を打つ．




表皮を引っ張り体腔に注射する．

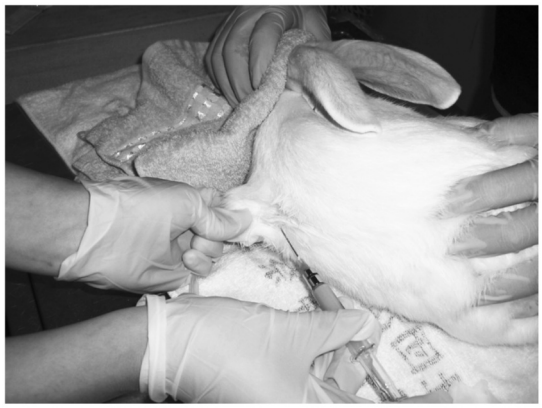


図 7：注射中の様子

頸動脈を引き出し採血する．煩雑な作業なので少なくとも 2 名で行うことが望ましい．

1　全採血の前日には，ウサギに水は与えるが，エサはやらない．
2　ハサミ，カンシ，ピンセット 2 本，10 cm に切った裁縫糸 2 本，解剖ハサミ，メスの柄はエタノールに浸けて消毒する．また，21 G の針の先端をU字に曲げたものを用意する．
3　ウサギを固定器に入れる．
4　ウサギの耳の静脈から注射で麻酔薬ネンブタールを 1.5–2 ml 投与する．始めは 1.5 ml 投与し，麻酔の効き

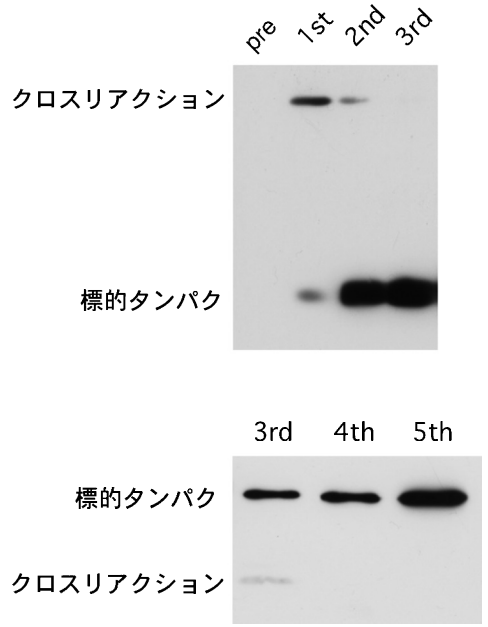



**図 8**：抗体力価のチェック
上；ウェスタン分析による試採血の血清の力価の検定．免疫前は何もシグナルが出ないが（pre），免疫回数が増加するに従って抗体力価が上昇するが，交差反応によるシグナル強度は低下している．下；別の抗体のチェック．5 回目の免疫まで抗体価が上昇した．

が悪いようであれば残りの 0.5 ml を追加する．麻酔薬は血流に乗せるため，針を血管の流れと同じ方向に刺す．麻酔の濃度が急に上がってウサギがショック死しないように，静脈が麻酔薬で透明にならない程の速さでゆっくりと投与する．

5　麻酔が効いてウサギがグッタリしたら固定器から出し，解剖台に仰向け乗せ，四肢と頭を固定する．

6　70%エタノールを喉の周りの毛にスプレーして濡らしてからハサミで刈る．

7　喉の皮を左右からピンセットでつまみ上げ，その真ん中をメスで切る．さらに正中線に沿って顎から胸の鎖骨の根元まで皮を切り開く（図 9）．

8　皮の内側にある腹膜を同様にピンセットで摘み上げてメスで切る．腹膜の下には血管が多く走っている．細い血管は切っても構わないが，太い血管は切らないように注意する．

9　腹膜の下の筋肉を，中心より少し左右どちらかよりに切り開いていくと（図 10 では右側より），食道の大きな管が見えてくる．すると，食道の横やや背面よりに，沿うように直径約 1 mm の頚動脈と白い神経が薄い膜に覆われて並んでいる（図 10）．メスで傷つけないように注意する．

10　頚動脈は丈夫なので，ピンセットで摘んで持ち上げ，糸で 3 重に縛る（図 11）．そこから数 mm 距離をおいてもう一カ所糸で同様に縛る．

11　心臓に近い方で縛った糸をカンシではさんで頚動脈を少しもち上げる（図 12）．

12　縛った 2 カ所の間で，頚動脈をハサミで切る（図

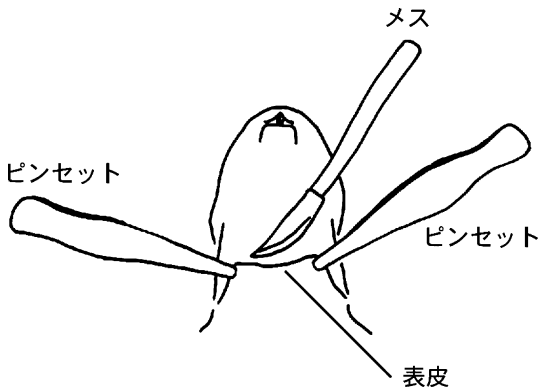



**図 9**：表皮を左右からつまみ上げ，メスで切る

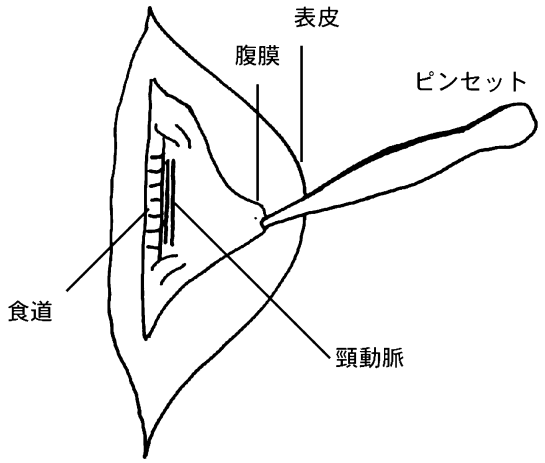



**図 10**：筋肉を切り開くと，食道の脇に頚動脈が走っているのがみえる．

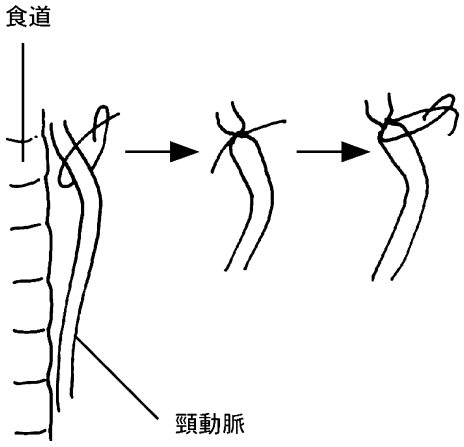



**図 11**：頚動脈を頭に近い部分二カ所で三重に縛る

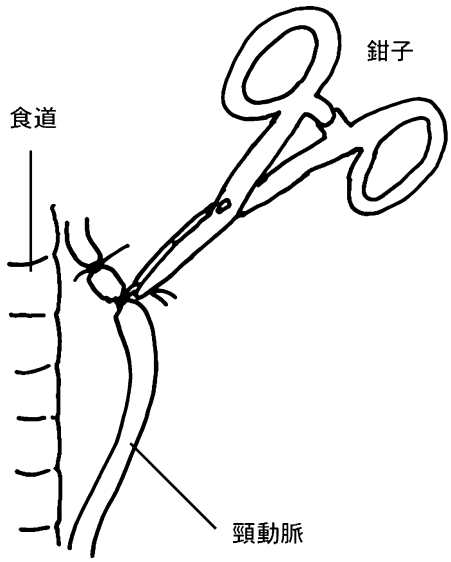



図 12：鉗子で心臓側の縛った糸をつかんで持ち上げる

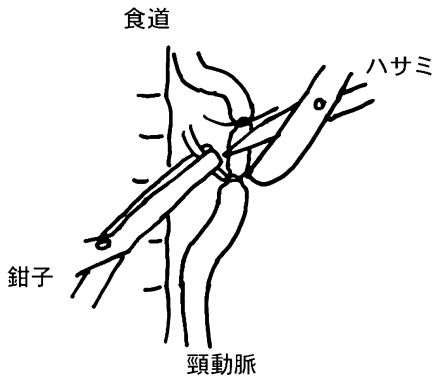



図 13：二カ所で縛った動脈の間を切る

13)．

13　カンシで頸動脈(心臓側の切り口)を 50 ml 遠沈管の口に近づける（図 14)．

14　U字に曲げた針で頸動脈に穴を開ける．このとき，血液が遠沈管の方向に飛び出るように穴を開ける（図 15)．

15　血液が勢いよく出すぎると，血圧が急激に下がり心臓が止まることがある.ピンセットで動脈をつまめば，血流を調整できる．血が抜けるにつれウサギの唇が紫に変わっていく．動脈に開けた穴が塞がって血液の出が悪くなったら，もう一度針で穴を開けてみる．また，心臓を手で押してマッサージすると，血液が出ることがある．さらに，ウサギの脚の固定を外して下半身を持ち上げりと，より多くの血液が回収できることがある．

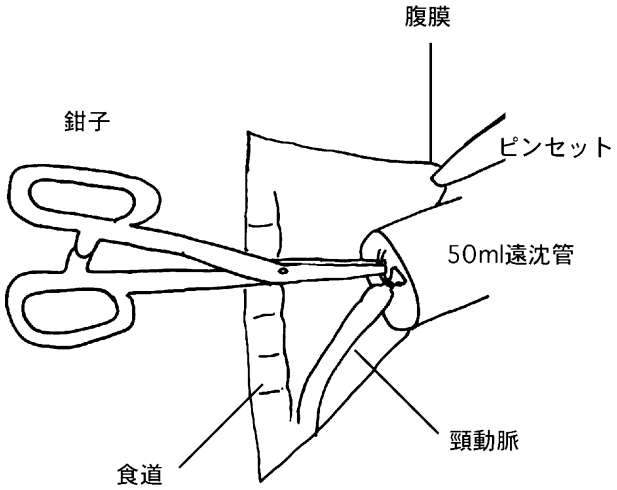



図 14：頸動脈を鉗子で遠沈管に誘導する

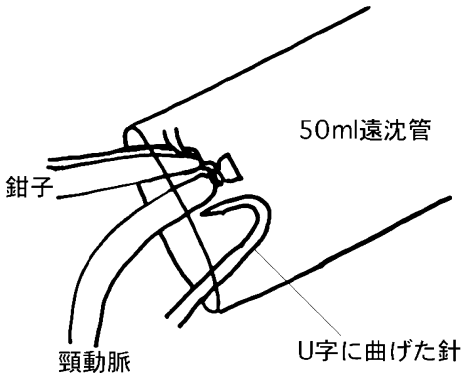



図 15：針で頸動脈に穴を開け，採血する

16　採集した血液は室温に 1 時間，4 ℃で一晩静置し，翌日に血清を回収する．

## 参考文献

1）G. H. Thorpe and L. J. Kricka, Methods Enzymol., 1986, 331-53

2）J. Sambrook and D. W. Russell, Molecular cloning: 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, 2001, 15. 9-11

3）R. D. Swerdlow, R. F. Ebert, P. Lee, C. Bonaventura and K. I. Miller, Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol., 1996, 537-48

4）T. Kitagawa and T. Aikawa, J. Biochemistry, 1976, 233-6

5）E. Harlow and D. Lane, Antibodies: Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, 1988, 98

# 6．タンパク質
## i．嫌気条件下でのタンパク質精製

藤田　祐一[1)]，野亦　次郎[2)]

ニトロゲナーゼに代表されるように酸素と触れることで速やかに活性が失われるタンパク質が多数存在する．このようなタンパク質を活性型として精製するために必要とされる嫌気的条件での操作を紹介する．

## Protein purification under anaerobic conditions

Yuichi Fujita, Jiro Nomata

Some proteins with oxygen-sensitive metallocenters such as nitrogenase are immediately inactivated upon exposure to oxygen.　Here we describe technical procedures for purification of oxygen-sensitive proteins under anaerobic conditions.

### 6.i.1　なぜ嫌気条件が必要なのか

大気中には21%の酸素（$O_2$）が含まれており，これと平衡化した水溶液には0.3 mM（25°C）の$O_2$が溶存している．たいていのタンパク質の酵素活性は，このような好気的な条件によって失われることはないが，$O_2$と触れることで速やかに活性が失われるタンパク質も多数存在する．もっとも有名な例は，窒素固定反応を触媒するニトロゲナーゼである[1)]．ニトロゲナーゼは，Fe-タンパク質とMoFe-タンパク質とよばれる2つのコンポーネントからなるが，これらいずれのコンポーネントも酸素に触れると数秒から数分というオーダーで不活性化される[2),3)]．こういった$O_2$感受性タンパク質の多くは，鉄と硫黄などから成る金属クラスターをもつ酸化還元酵素である．$O_2$は，これらの金属クラスターを破壊することで酵素を速やかに失活させてしまう．ニトロゲナーゼに限らず，酸素に触れることによってその金属中心が破壊され，不活性化してしまう酵素やタンパク質がこれまでに多く報告されている．光合成に関連するタンパク質では，光化学系Ⅰの鉄硫黄中心$F_A/F_B$を保持する表在性タンパク質PsaCが高い$O_2$感受性を示し[4)]，Fxを保持するコアタンパク質PsaA/PsaBと再構成するためには嫌気条件が必要とされる[5)]．今後，新たな酵素やタンパク質について生化学的な研究が進むにつれて，このような$O_2$感受性を示すタンパク質の例がますます蓄積していくと考えられる．実際，ラジカルSAMとよばれるユニークな[4Fe-4S]クラスターをもつ$O_2$感受性の酵素群が最近見いだされ，光合成生物を含む多くの生物に広く分布することがわかってきた[6)]．$O_2$に感受性を示すタンパク質の多くは，酸化還元反応に関わっており，光合成に関連する酵素でも，生化学的な解析を進めるうちに，このような$O_2$感受性酵素に出会う（出くわす），あるいは，既知の$O_2$感受性酵素を取り扱う必要性が生じることもありうる．筆者らは，（バクテリオ）クロロフィル生合成系で機能する$O_2$感受性の酵素として，ニトロゲナーゼと構造的な類似性をもつプロトクロロフィリド還元酵素を研究してきたので，ここに嫌気的環境のセッティングと嫌気条件下でのタンパク質の精製などについて紹介する．

1）名古屋大学大学院生命農学研究科；さきがけ・JST
2）名古屋大学大学院生命農学研究科：日本学術振興会特別研究員

### 6.i.2　嫌気環境のセッティング

#### 6.i.2.1　嫌気チャンバー

嫌気的環境は，市販の嫌気チャンバーを利用することで確立することができる．筆者らの研究室では，アメリカのCOY社（COY Laboratory Products Inc., Grass Lake, Michigan，日本の輸入代理店は東洋紡エンジニアリング）のAnaerobic chamber（嫌気チャンバー）を愛用している（図1）．この嫌気チャンバーは，透明なビニール（PVC vinyl）製で，水素ガスを少量（1〜5%程度）含む窒素ガスで内部を満たして使用する．このため，エアロック（前室）（図1a）に窒素ガスボンベ（高純度窒素；純度99.9999%以上；図1d）と混合ガスボンベ（10% $H_2$-5% $CO_2$-$N_2$バランスの標準ガス；図1c；$CO_2$はチャンバー内で光合成生物を培養することを想定して添

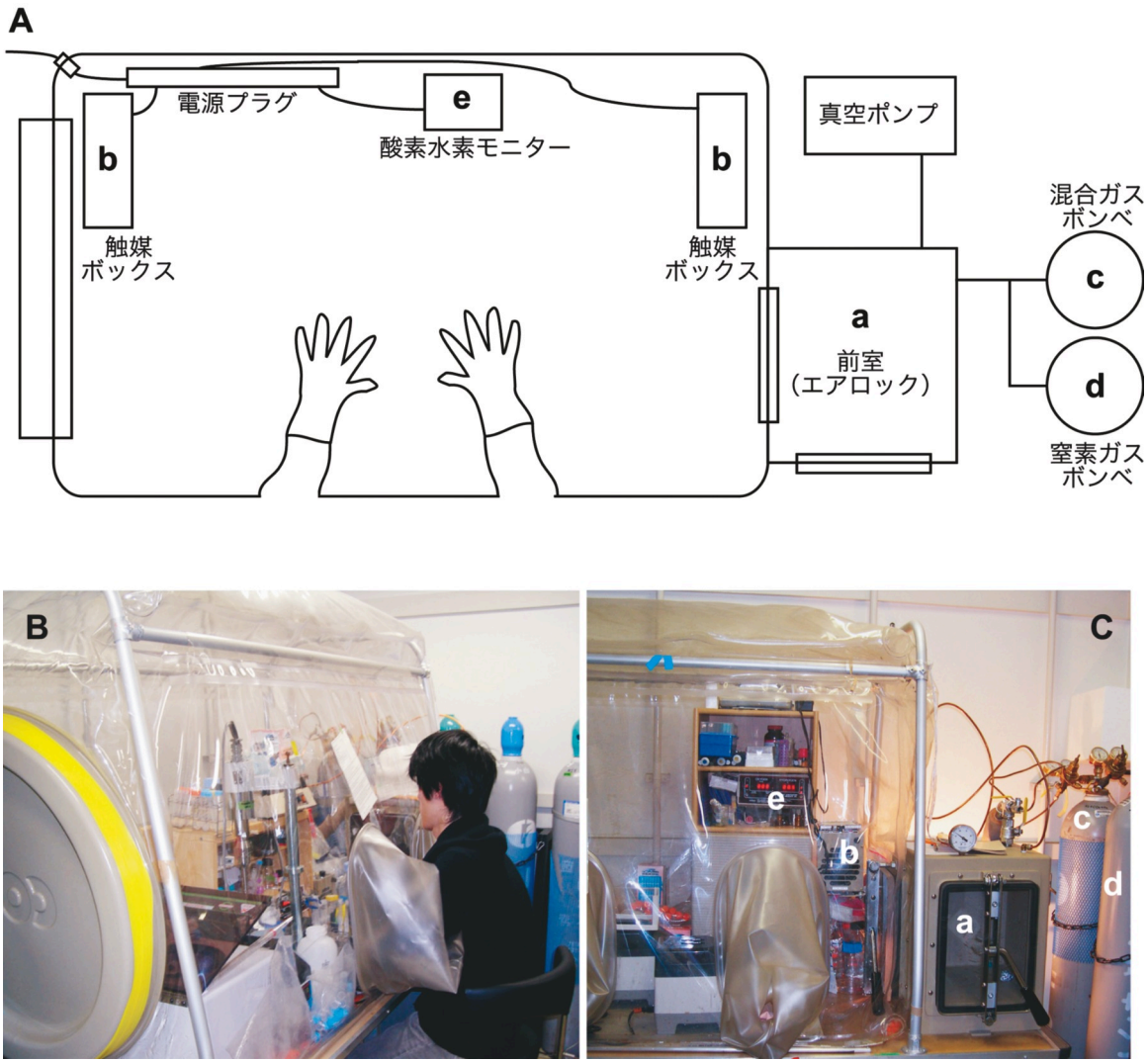



**図1**：嫌気チャンバー（A）嫌気チャンバーの構成図．（B）嫌気チャンバーで操作している著者．（C）前室付近．a〜e の記号は，A と共通している．

加しているが，そうでなければ除外する．）それに，排気用の真空ポンプを接続して使用する．これらのガスボンベは市販されているが，混合ガスは基本的に受注生産なので，1ヶ月程度の納期を要する．

### 6.i.2.2　嫌気性が確保される理由

嫌気チャンバー内部の $O_2$ レベルがほぼ 1 ppm 以下という嫌気的環境を保持することができるのは，嫌気チャンバー内に設置しているパラジウム触媒（アルミナがコートされた塩化パラジウム）によって混入する $O_2$ が水素と反応して水に変換されて除去されているためである．チャンバー内に少量の水素を導入しているのはこのためである．また，パラジウム触媒が置かれている触媒ボックス（図 1 b）のファンにより内部の空気を一定の割合でパラジウム触媒にふれるように常に循環させている．こうすることで，試料の出し入れや外部からの拡散などによりわずかずつ混入してくる $O_2$ を，効率よく除去し，チャンバー内の嫌気性を保っている．$O_2$ 除去で生じた水は，表面のアルミナに吸着保持されるため，1，2 週間おきにパラジウム触媒を乾熱処理（125℃，2 時間）によって再生して使用する[7]．

### 6.i.2.3　嫌気状態のモニター

内部の嫌気状態をモニターするために，酸素水素検出器（ガスアナライザー，モデル 10，COY 社；図 1 e）を設置している．この酸素水素検出器は，酸素レベルと水素レベルを同時に計測できるので，嫌気チャンバー内の酸素レベル（ppm）と水素レベル（%）を確認するために設置している．

### 6.i.2.4　嫌気チャンバーへの器具などの取入れ

嫌気チャンバーへの器具などの出し入れは，ボンベと真空ポンプが接続されているエアロックを経由して行

う．チャンバーに入れたい器具などは，最初エアロックに入れ，エアロック内を嫌気状態にした後に，エアロックとチャンバーとの間のエントリーポートを開けて本体へ入れる．このため，まず真空ポンプによるエアロック内の空気の排出とガスボンベからの窒素ガスによるガス置換というサイクルを3回繰り返す（3回目のガスの流入は水素を含む混合ガスで行う）．この一連のガス置換を行うことによりエアロック内の酸素レベルは7,600 ppm程度まで低下する（ガス置換操作で酸素レベルを0にすることはできない）．こうして初めてチャンバー側のエアロックを開き，エアロックに搬入した器具などをチャンバー本体側に移動する．同時に，この操作で，エアロック内に残存した$O_2$がチャンバー内に流入し，チャンバー本体の酸素レベルは260 ppm程度（チャンバー本体の体積によって決まるが，この値はAタイプのチャンバーの場合）となる[7]．こうして不可避的に流入した$O_2$は，上述のパラジウム触媒の作用で除かれて$O_2$レベルは1 ppm未満（酸素水素検出器の読みでは0 ppm）が保持される．

タンパク質の精製や活性測定の操作では，多くのプラスチック製の遠沈管やサンプルチューブを使用する．これらプラスチック製のチューブ類の取り入れには注意を要する．まず，チューブ内には空気が入っているので，エアロックに入れる前にチューブ類のフタを開いておいて，エアロックでのガス交換でチューブの中の空気が置換しやすいようにする．本体とフタを別々にしておくとよい．また，プラスチック自体に$O_2$が溶け込んでいる．これはチャンバー内で平衡によって徐々に除去するほかないので，使用する一週間以上前にチャンバーに入れておく．

#### 6.i.2.5　チャンバー内での冷却

タンパク質の精製では，タンパク質を低温に保つことが重要である．通常の精製操作では試料や溶液を冷却するために氷を利用するが，氷自体が大量の$O_2$を溶存しているので，チャンバーに氷を持ち込んで使用することは，嫌気度維持という点で問題である．したがって，チャンバー内でどのように低温を確保するための工夫を要する．筆者らは，氷に代わりにミラクルビーズをミニ恒温槽（e-Bucket EIB（3℃固定タイプ），TAITEC）で冷却して利用している．これに加え，精製や活性測定に必要なさまざまなストック溶液などを冷蔵するために，小型の冷蔵庫をチャンバー内に設置している．ただ，冷蔵庫の排熱のためにチャンバー内部の温度が30℃以上になってしまうので，チャンバーを設置している実験室を適宜冷房し，チャンバー内部の温度上昇を抑えている．また，チャンバー外にサーキュレータを設置し，チャンバー内部に電線を導入しているブチルキャップを通して冷却水の循環系（循環する水はチャンバーの空気に接触しない）を作って冷却することも有効である．

#### 6.i.2.6　溶液の調製

大気と平衡化した溶液には，大量の$O_2$が溶存している．したがって，嫌気操作で使用するためには溶液の溶存$O_2$を除去しておく必要がある．前もって，窒素ガスをパージすることで積極的に$O_2$を追い出すこともできるが，筆者らは，使用する溶液を1週間以上前にチャンバーに入れ，フタをゆるめて放置しておく．こうすることで嫌気チャンバーのガスと平衡化することで徐々に$O_2$を除く．しかし，この方法では短期間には完全に溶存$O_2$が除去できない．このため，ほぼ全ての溶液に対し使用直前にジチオナイト（亜ジチオン酸ナトリウム sodium hydrosulfite）を終濃度1.7 mMになるように加えることで，完全に$O_2$を除去する．ジチオナイト溶液は，粉末を0.1 M $NaHCO_3$に溶解して調製するが，$O_2$と反応して酸化していくため使用当日に調製する．また，ジチオナイト粉末は，乾燥状態であれば空気中でも安定ということにはなっているが，保存には注意を要する．ジチオナイトは強力な還元剤のため人工的な電子供与体としてさまざまな酵素活性測定に利用されるが，活性が認められない時の原因がジチオナイトの変質によることが多い．筆者らの研究室では，ジチオナイト粉末は嫌気チャンバー内で保存し，使用するときにはチャンバー内に設置した小型電子天秤で秤量し，チャンバー内に保存している0.1 M $NaHCO_3$溶液に溶かして使用している．

### 6.i.3　嫌気条件でのタンパク質の精製

精製しようとするタンパク質がどの程度の$O_2$感受性を示すかによって，精製の過程でどの程度嫌気的環境の保持に注意を払うべきかが異なってくるが，ここでは，精製した状態で空気にさらすと1分以内に活性が消失するという非常に高い$O_2$感受性を示す酵素プロトクロロフィリド還元酵素の還元コンポーネントL-タンパク質を活性型として精製した例で記す[8]．L-タンパク質は，ニトロゲナーゼのFe-タンパク質と構造的に類似しており，Fe-タンパク質と同様にホモ二量体当たり1個の［4Fe-4S］クラスターをもつ[8]．この鉄硫黄クラスターが$O_2$による不活性化のターゲットとなる．L-タンパク質は，細胞破砕から精製，活性測定という一連の操作すべてにおいて嫌気条件を保持しておく必要があり，結果として嫌気チャンバー内でほぼすべての操作を行う必要が

ある．また，チャンバーでの操作をできる限り簡便にするために，特異性の高いアフィニティタグを付加し，*E. coli* などでの大量発現系を確立しておくことが重要である．筆者らは，Strep タグ（ストレプトアビジンとビオチンとの相互作用を模した8アミノ酸残基（WSHPQFEK）から成るアフィニティタグ）をN末端に付加した融合タンパク質として *E. coli* や光合成細菌などで大量発現させて精製を行っている[8),9)]．

### 6.i.3.1 集菌

集菌の段階での嫌気状態への配慮も目的とするタンパク質の感受性の程度によるので一概には言えない．しかし，筆者らの経験では，*E. coli* は好気的に培養されても，細胞内部は比較的嫌気状態が保たれており，集菌操作自体には嫌気条件を必要とせず，L-タンパク質のような高い $O_2$ 感受性を示すタンパク質の場合でも，集菌は通常のタンパク質の精製と同じようにチャンバー外で行うことができる[9)]．もし，集菌操作自体も嫌気条件を必要とする場合，嫌気チャンバー内で超遠心機用の遠沈管に分注し，超遠心機によって集菌を行う．超遠心機は，稼働中は真空ポンプによって高い真空度が得られる上，超遠心用の遠沈管は気密性が高いため，超遠心操作でも嫌気的条件が確保される．

### 6.i.3.2 細胞の破砕と粗抽出液の調製

多くの酵素がもっとも失活しやすいのは，細胞の破砕の段階である．そこで，集菌した L-タンパク質を発現する *E. coli* 細胞のペレットの段階で嫌気チャンバーに持ち込む．チャンバー内に前もって破砕用バッファー（要冷却；100 mM HEPES-KOH；pH 7.4，10 mM $MgCl_2$，1 M グリセロール，5 mM EDTA，1 mM DTT，10 mM $\beta$-メルカプトエタノール）を用意しておく．上述のように使用直前にジチオナイトを添加した破砕用バッファーで細胞を懸濁し，嫌気チャンバー内に設置したソニケーター（Sonifier 250, Branson）を 30 秒間バースト（50% 間欠出力）を 3 回（バースト間 1 分間恒温槽で冷却）繰り返し，細胞を破砕する．得られた細胞破砕溶液を超遠心用遠沈管に回収し，超遠心（37,000 g，1 時間；日立 RP50-2 ロータ，30 PC 遠沈管）によって上清画分を調製する．この上清画分をチャンバー内に用意したアフィニティーカラム（Strep タグとの融合タンパク質では，Strep-Tactin カラム）にロードする．アフィニティーカラムの操作は，$O_2$ を含まない溶液を使うという点以外は基本的にチャンバー外で行うのと同じである．タンパク質をゲルろ過やイオン交換などによりさらに精製するために，小型のクロマトシステム（例えば ÄKTAprime；GE）を嫌気チャンバーに持ち込んで使用する場合もある[10)]．

### 6.i.3.3 酵素活性の測定

酵素活性測定についても嫌気条件が必要であるため，酵素活性溶液の混合，分注をチャンバー内で行う．チャンバー内に適当な恒温槽が設置されていれば，全ての操作をチャンバー内部で完結させることができる．もし，チャンバーの外の恒温槽でインキュベートしなければならない場合は，小さなガラスバイアルにアッセイ溶液を分注し，ブチルゴムキャップでしっかり密閉してからエアロックを経由して，チャンバーの外に出しインキュベートを開始する．この場合，ブチルゴムキャップを装着したり，エアロックを経由したりするため，溶液を混合してから恒温槽にセットするまでに数分のデッドタイムがどうしても生じてしまい，短時間でのアッセイには不向きである．反応を分光学的に追跡可能な酵素反応の場合，蓋付きのブラックセルがあると便利である．嫌気チャンバー内で，ATP 溶液などの反応を開始させるための溶液だけを除いて反応溶液を調製しブラックセルに分注する．ATP 溶液（数 $\mu$l）を反応溶液に触れないようにセルの上部に付着させて，しっかりふたを閉めて，チャンバーの外に出す．セルをたたいて ATP 溶液を反応溶液に混合して反応をスタートさせ，所定の波長の吸収変化を経時的にモニターすることで容易に反応の初速度を測定することができる．

### 6.i.3.4 嫌気条件での培養

最後に，ラン藻や緑藻などの通常は好気的な条件で培養する光合成生物を嫌気条件下で培養する方法を紹介する．液体培養では，通常のラン藻などの培養では $CO_2$ レベルを 1％から 2％に高めた空気を通気して培養しているが，この通気ラインの空気供給のライン（通常エアーポンプで送り出している）を窒素ガスボンベにつなぎ替える．通常の窒素ガスボンベは 47 リットルに 150 気圧程度で圧縮してあるので，1 l/min で流し続けると 5 日弱は連続して使用できる．ただし，窒素ガスを供給するので，培養室の換気には注意を要する．また，寒天培地の場合は，GasPak（BBL GasPak 100 anaerobic systems, Becton Dickinson and Company, Sparks, MD；シャーレが 12 枚まで収納可能）という嫌気性細菌培養用の専用容器を利用する．専用のパウチ（BBL GasPak Plus Anaerobic System Envelopes with Palladium Catalyst）に 10 ml の水を添加し，GasPak に入れて密閉すると，容器内の空気から $O_2$ が除去されて嫌気条件となる．これは，水の添加により水素化ホウ素ナトリウムのタブレットから水素が発生し，パウチに添付してあるパラジウム触媒により嫌気チャンバーと同様の原理で $O_2$ を水

に変換されて除かれるためである．このパウチでは，同時に $CO_2$ も生成し水添加後 1 時間で 4 ～10％の $CO_2$ レベルとなり，光合成生物の成育を促進する．嫌気条件をモニターするため，メチレンブルーを発色指示薬とした試験紙（BBL Dry Anaerobic Indicator Strips）を容器内に入れておく．嫌気的になるとメチレンブルーが青から無色へと色が変化するので確認に便利である．パウチに水を加えて容器を密閉し，数時間で試験紙が無色になる．光合成生物の培養装置などの光条件下に容器ごとおくことで，嫌気的条件での光合成的培養が可能である．この条件で，*Rhodobacter capsulatus* などの光合成細菌を光合成的に生育させることができる．ヘテロシストをもたない窒素固定性のラン藻（*Leptolyngbya boryana* など）を窒素固定的に生育させることも可能である[11]．また，このような嫌気条件で培養することにより初めて単離可能となったラン藻の変異株の例もある[12]．

## 参考文献


1）R. Y. Igarashi & L. C. Seefeldt, Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. **38** (2003) 351.

2）R. R. Eady, B. E. Smith, K. A. Cook & J. R. Postgate Biochem. J. **128** (1972) 655.

3）M. G. Yates & K. Planqué, Eur. J. Biochem. **60** (1975) 467.

4）H. Oh-oka, Y. Takahashi, K. Kuriyama, K. Saeki & H. Matsubara, J. Biochem. **103** (1988) 962.

5）N. Li, J. Zhao, P. V. Warren, J. T. Warden, D. A. Bryant & J. H. Golbeck, Biochemistry, **30** (1991) 7863.

6）S. C. Wang & P. A. Frey, Trends Biochem. Sci. **32** (2007) 101.

7）Anaerobic Chamber Instruction Manual, COY Laboratory Products Inc.

8）J. Nomata, M. Kitashima, K. Inoue & Y. Fujita, FEBS Lett. **580** (2006) 6151.

9）H. Yamamoto, J. Nomata & Y. Fujita, Photochem. Photobiol. Sci. **7** (2008) 1238.

10）J. Nomata, L. R. Swem, C. E. Bauer & Y. Fujita, Biochim. Biophys. Acta **1708** (2005) 229.

11）Y. Fujita, Y. Takahashi, M. Chuganji & H. Matsubara, Plant Cell Physiol. **33** (1992) 81.

12）K. Minamizaki, T. Mizoguchi, T. Goto, H. Tamiaki & Y. Fujita, J. Biol. Chem. **283** (2008) 2684.

# 4章

# 分光測定

# 1．分光測定の基礎

小池　裕幸[1)]

分光測定は，今や生化学，分子生物学では欠かすことのできない基本測定法である．さらに，光合成の分野では光誘起の微少スペクトル変化の測定も，分光光度計を使ってなされる．本項ではこの分光測定の基礎と，その装置の仕組みを解説する．

## Principles of spectrophotometry and measurement of action spectra and quantum yield

Hiroyuki Koike

Principles of spectrophotometry are described. Spectrophotometer is basically composed of three parts; light-source, a monochrometer and a detector. Properties of the three parts are described in detail. Techniques to measure spectra of turbid samples and the samples at 77K are also described. Principles and techniques to determine action spectra and quantum yields are described.

## 1.a　装置と基本原理

光合成にはたらく物質は紫外・可視から近赤外に吸収を持つものがほとんどで，この領域の吸収スペクトルを測定できる市販の分光光度計が，標準の測定装置になる．一方，光照射に伴う反応中心やシトクロム等の吸光度変化を測定する場合は，市販の分光光度計を改造したり，装置を自作したりすることが多い(4.2　分光測定法で詳述)．なお，測定試料はクロロフィルやカロチノイド等，可視部に吸収を持つものがほとんどであるが，光合成細菌の場合は1,000 nm付近まで吸収を持つ試料もある．また，透明なものばかりではなく，混濁試料の場合も多い．本項ではこれらの測定法も含めて，装置の原理および試料の測定法について解説する．

### 1.a.1　Lambert-Beerの法則

吸光度測定の原理は，単色光が試料を透過する間に吸収された光量を測定するものである．濃度 $c$ ($c$ $mM$) の試料を吸収セルに入れ，これに強度 $I_0$ の単色光が光路長 $\ell$ を透過したときに強度が $I$ になったとする．単色光が試料中を $dl$ 分だけ通過したときに吸収されて減少する光量を $-dI$ とすると，この量は微少区間 $dl$ への入射光量 $I$ に比例し，また通過距離 $dl$ にも比例する．したがって，

$$-dI = k'Idl \tag{4.1}$$

と表すことができる．これを変形すると，

$$-\frac{dI}{I} = k'dl \tag{4.2}$$

となり，両辺をそれぞれ $I_0$ から $I$，0から $\ell$ まで積分すると，

$$-\int_0^I \frac{dI}{I} = k'\int_0^l dl \tag{4.3}$$

$$-(\ln I - \ln I_0) = k'l \tag{4.4}$$

$$-\ln\frac{I}{I_0} = k'l \tag{4.5}$$

これを常用対数に直すと，

$$-\log\frac{I}{I_0} = k_1 l \tag{4.6}$$

という式が得られる（底の変換の結果出現する定数を $k'$ に掛けたものを新たに $k_1$ とした)．すなわち，透過光の強さは被測定試料の長さが増加すると指数関数的に減少する．

ここで，透過した単色光の中にある溶質分子 $n$ は，試

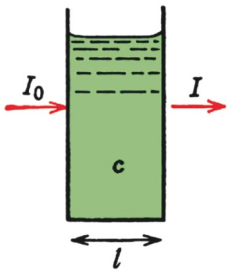



図4.1.1：光の吸収

1）中央大学理工学部生命科学科

料の長さ $\ell$ に比例するので，

$$-\log\frac{I}{I_0}=k_2 n \qquad (4.7)$$

とすることができる．この分子数 $n$ は濃度 $c$ に比例するので，

$$-\log\frac{I}{I_0}=k_3 c \qquad (4.8)$$

と書き換えることができる．したがって，透過光の強さは，溶液濃度が上がるに従い，やはり指数関数的に減少する．

以上のことから$-\log(I/I_0)$は光の通過距離にも，溶液の濃度にも比例することが分かる．したがって，$-\log(I/I_0)$は両者の積にも比例するため，

$$-\log\frac{I}{I_0}=\varepsilon cl \qquad (4.9)$$

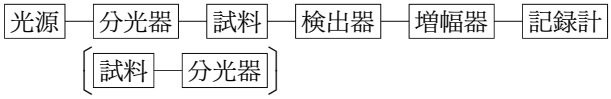
と書くことができる．ここで，$\varepsilon$ は $c$ をモル濃度で表したときの比例定数で，吸光係数（extinction coefficient）と呼ばれる．特に，$c$ を $mM$ で表したときの $\varepsilon$ は mM 吸光係数（milimolar extinction coefficient）と呼ばれ，実際はこちらの方が多用される．また，$I/I_0$ を透過度（transmittance）といい，$T$ で表す．これを％で表したときには透過率（percent transmittance）と呼び，$T$％と表現する．また，$-\log(I/I_0)$を吸光度（absorbance）といい，$A$ で表す．したがって吸光度は，

$$A=-\log T=-\log\frac{I}{I_0}=\varepsilon cl \qquad (4.10)$$

と表すことができる．この法則は Lambert-Beer の法則と呼ばれ，分光測定の基本となる．この法則が成立するには，a）測定光は単色光で，b）溶液は透明，c）溶質の状態は濃度に依存しない（高濃度での分子同士の会合や，逆に低濃度での解離が起きたりして吸光係数が変化しない）という条件が必要である．

### 1.a.2　機器の構成

分光光度計には光源，分光器，検出器の 3 つが必須である．これは可視・紫外吸収スペクトル測定用の分光光度計だけでなく，蛍光光度計（蛍光を出す試料が光源に相当する）や，赤外分光光度計，放射光施設を用いた XENES 測定でも基本的に同じである．通常の紫外・可視分光光度計の場合は，光源として測定波長領域で発光があるもの，すなわち重水素放電管，タングステン・ハロゲンランプ，キセノンランプを用いる．光源からの光は分光器（モノクロメーター）で単色光にして試料に当てる．分光器は現在ほとんどの場合，回折格子が用いられているが，プリズムを組み合わせる場合もある．検出器としては光電子増倍管が普通用いられる．最近はフォトダイオードを使い，検出部をコンパクトにしたものもみられる．光電子増倍管は 900 nm より長波長では感度がほとんどなくなるので，光合成細菌のように 1,000 nm 付近まで測定する必要がある場合には PbS セルと併用している測定機を使う．検出された信号は増幅され，記録される．以前はレコーダー上に直接記録するものが主流であったが，最近は測定値はデジタル化されて分光光度計付属のディスプレイに表示されたり，コンピュータに転送されてグラフソフトで表示でき，データ処理が容易になった．




分光光度計の構成は上のようになっているが，分光器と試料の順序を入れ替えて，試料に白色光を照射し，分光器で分光した後，フォトダイオードアレイで検出して短時間の内にスペクトルを測定できる装置（ポリクロメーター）も売り出されている．HPLC 用には，単一波長をモニターする検出器のほかに，このタイプのものもよく使われる．

## 1.b　光源

上にも述べたように，測定波長域をカバーする連続光源が必要である．〝連続〟とは波長も，時間も切れ目のない（例えば輝線が非常に大きいとか，パルス的に光がでるようなものではない）光源という意味である．光照射で誘起される吸収変化を時間を変えて追跡するような場合に，光源からの単色光をシャッターを用いてミリ秒や秒単位で切り，その強度を測定する場合もあるが，ここでは割愛する．

### 1.b.1　重水素放電管

放電管中に数 Torr 程度の重水素を封入し，この中で放電を行うと 170～400 nm にわたって連続した発光スペクトルが得られる．発光部は放電電極を取り囲むように遮蔽ケースが置かれ，電極部に穴（ピンホール）が開いている．放電による発光はこの穴で起こる．このような重水素放電管を紫外部の吸収スペクトル測定用光源として用いる．生物試料用の紫外可視分光光度計では 190～370 nm の波長領域で用いられる．なお，可視部の 486.5 nm にも輝線があり，これは波長駆動部の波長校正などに使われる．

### 1.b.2　タングステンランプ（タングステンヨウ素ランプ）

可視光領域の吸収スペクトル測定に用いられる光源である．通常の測定波長領域は 370～900 nm だが，検出器

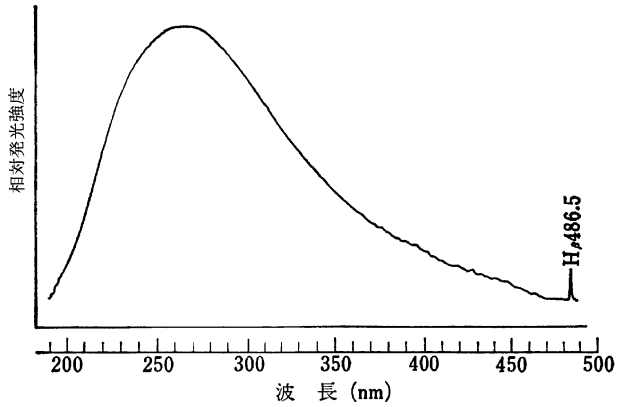


図 4.1.2：重水素ランプの発光スペクトル

を交換してさらに近赤外部までこの光源で測定出来る．タングステンランプは，平たく言うと普通の白熱電球で，以下のような特徴を持つ．①連続スペクトルを示す②赤～赤外部で強度が最大になる③輝度が高い④長時間安定に点灯できる．放射スペクトルは，ほぼ黒体放射の式に従う．すなわち，放射エネルギーの波長特性は発光体温度に依存する（図 4.1.3）．

ハロゲンランプ（ヨウ素ランプ）は，タングステンランプのフィラメントの寿命を延ばし，発光温度を高くできるようにしたものである．フィラメントに電流を通して発光させるとタングステンが気化する．気化したタングステンが，ランプの低温部でハロゲン（ヨウ素）と結合し，ハロゲン化タングステンが出来る．これがフィラメント付近の温度で分解して元に戻る．このため，フィラメントから気化したタングステンが絶えずフィラメントに供給されることでフィラメントの消耗が抑えられ，フィラメント温度を高くして発光ピークを短波長にすることができる．

### 1.b.3 キセノンランプ

キセノンランプを吸収スペクトル測定用の光源として

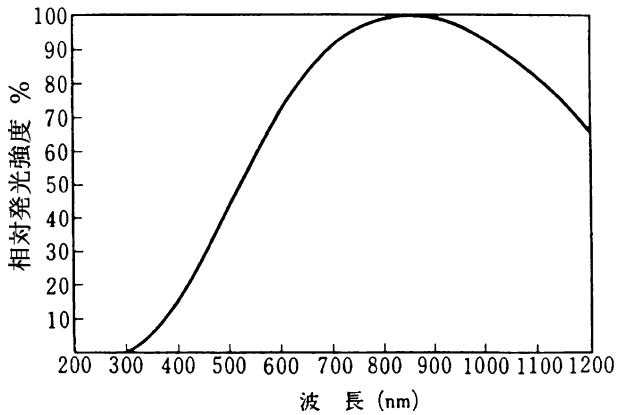


図 4.1.3：タングステンランプの発光スペクトル

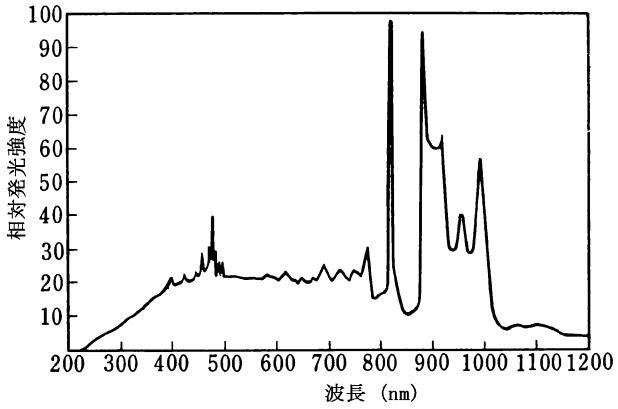


図 4.1.4：キセノンランプの発光スペクトル

使う例はあまりない．しかし，発光スペクトル(図 4.1.4)に示すように，近赤外部に輝線があるものの，400～750 nm にかけてほぼフラットな発光強度が得られるので，酸素発生型光合成生物から調製された試料の測定に有利である．ただ，一般的に発光強度が強く，長時間の照射は試料を損傷したり，測定光が励起光になって試料中の電子伝達成分が酸化や還元される．そのため，測定光用には，ニュートラルデンシティフィルター（減光フィルター）で減光したり，シャッターを用いて試料励起の前後のみにあてるといった工夫がいる．キセノンランプは発光管内部に 10 気圧程度のキセノンを封入し，電極間の放電で発光するので (図 4.1.5)，発光面の揺らぎで光強度が微妙に揺らぎ，微少な吸光度変化の測定にはあまり適さない．数ミリ秒から数十ミリ秒程度の短時間なら発光面の変化は小さいので，フラッシュ励起後の短時間内の測定で，強い測定光を必要とする測定には用いられる．

## 1.c.1 分光器

連続スペクトルを示す光源から分光光度計に必要な単色光を取り出すための装置が分光器である．現在使われている主な分光器は反射型回折格子とプリズムである．それぞれ一長一短があるが，回折格子の方が分光光度計の波長駆動装置を単純化できるので，現在はこれが主流である．

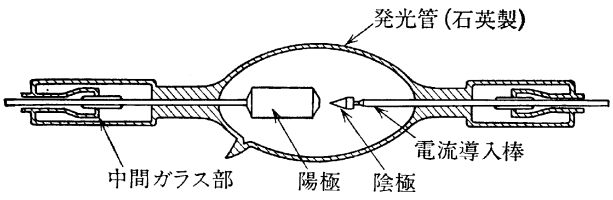


図 4.1.5：キセノンランプの構造

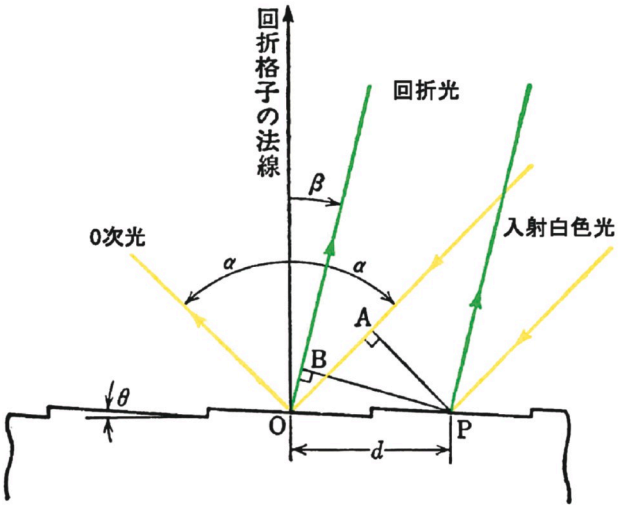



図 4.1.6：回折格子と回折光の反射

### 1.c.1　回折格子

回折格子は，図 4.1.6 に示すように，反射面に階段状の溝が一定幅で精密に刻まれた鏡である．回折格子に入射した白色光はそれぞれの溝で回折され，色々な方向に出ていく．回折光はそれぞれ互いに干渉し合い，位相が合わない大部分の波長光は弱めあい，特定波長の光が特定角度で回折された場合のみ強めあい，その波長の光が出る．この強め合う干渉波長は角度により連続的に変わるので，白色光がいわゆる虹色に分光される．

いま，回折格子に入射角 $\alpha$ で白色の平行光線が入ってきたとする．この時格子面で回折された光が回折角 $\beta$ で反射して出ていくとする．この時互いに強め合う干渉が起こるためには，光の位相がP点とB点で揃っていなければならない．そのためには，線分 AO＋線分 OB が波長 $\lambda$ の整数倍にならなければならない．

$$\overline{AO}=d\sin\alpha,\quad \overline{OB}=d\sin\beta \qquad (4.11)$$

であるから，光が強め合う回折条件は，

$$d(\sin\alpha+\sin\beta)=n\lambda \qquad (4.12)$$

と表せる．ここで，$\lambda$ は波長，$n$ は整数で，干渉次数と呼ばれる．

いま回折角 $\beta$ が $\beta=-\alpha$，すなわち普通の鏡と同じように反射する場合，左辺が 0 なので，右辺は $n=0$ となる．この条件下では，波長 $\lambda$ の値に依存せず上の式が成立する．これは 0 次光と呼ばれ，白色光が反射して出て行くことになる．次に $n\neq0$ の時は，波長 $\lambda$ が変わると回折条件（干渉を強める条件）を満たす回折角 $\beta$ が変化する．このため，回折格子の角度を変えることで白色光を波長ごとに分離できる．

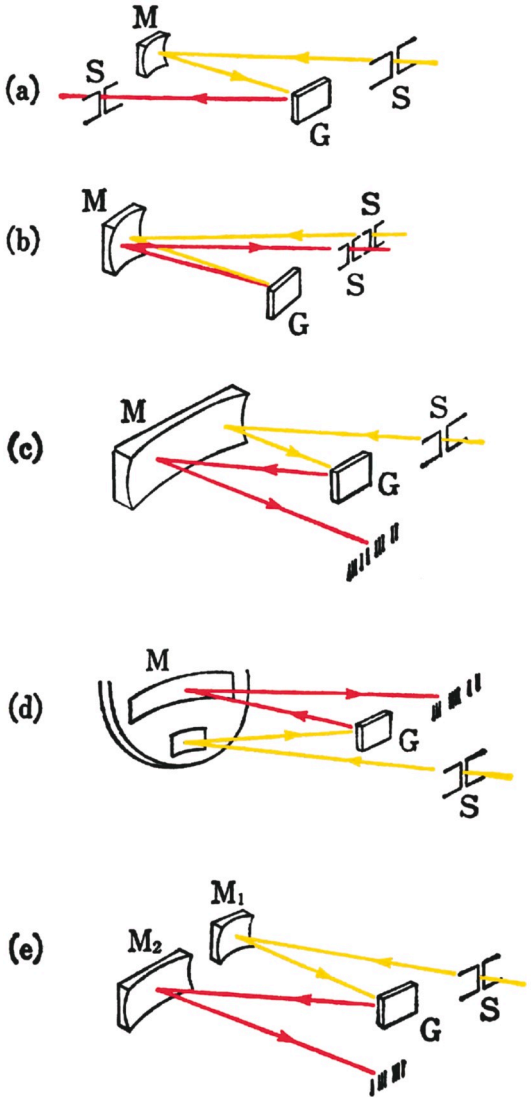



図 4.1.7：回折格子を使った光学系．文献(1)を改変

実際の回折格子を使った分光器では，図 4.1.7 に示すように 5 つの代表的な光学系が使われている[1]．上の 2 つは出射側にもスリットがつけられているので，単色光が取り出せ，モノクロメーターとして使われる．また，下の 3 つはモノクロメーターとしても使えるし，虹色に広がった複数波長の光を取り出すポリクロメーターとしても使うことができる．

上の式で示した回折条件は，$n=1$ の時だけではなく，$n=2, 3, \cdots\cdots$の場合も成立し，これらの波長の光を高次光と呼ぶ．高次光の回折効率は非常に低いが，試料が $\lambda$ の波長域の光を強く吸収するような場合には，吸収を受けない高次光が測定され誤った測定結果が得られる場合がある．この点については 4.2.2.b で解説する．

### 1.c.2　プリズム

小学校の理科の授業でも出てくるプリズムである．ガ

ラスの三角柱（石英でも透明アクリルでもよい）に光を通すと，屈折率が波長によって異なるのを利用して光を分離できる．

図 4.1.8(b)にプリズムを通る光線の光路を示す．いまプリズム面の法線に対して角度 $\alpha$ で白色光が入射し，屈折されて角 $\beta$ でプリズム内を進み，反対側の面に角 $\beta$'で到達し，再び屈折されて角 $\alpha$' で分光された光が出るとする．また，入射光と出射光のなす角を $\theta$，プリズムの頂角を $A$ とする．この時，

$$\sin\alpha = n\sin\beta \tag{4.13}$$

$$\sin\alpha' = n\sin\beta' \tag{4.14}$$

$$\alpha + \alpha' = A + \theta \tag{4.15}$$

$$\beta + \beta' = A \tag{4.16}$$

が成立する．ここで，$n$ はプリズムの屈折率である．この式において，$\alpha = \alpha'$，$\beta = \beta'$のとき $\theta$ は最小になり，これを最小偏角という．普通プリズムは最小偏角か，それに近い条件で使用される．

プリズム分光器は回折格子と違って，原理的に高次光が混入しないのできれいな単色光を取り出せるという利点がある．ただし，光の分解能は波数（波長 $\lambda$ の逆数）に比例するので，紫外部の分解能は高く赤外域の分解能は下がる．しかし，通常の紫外・可視分光光度計ではスペクトルは等間隔に目盛った波長に対してプロットされるので，これを機械的に補正しようとすると，プリズムの駆動系は回折格子の場合より複雑になる．

## 1.d　検出器

紫外・可視分光測定に用いられる検出器の主流は光電子増倍管である．これは光の光電効果を利用したものであり，光電子を増幅して検出するものである．もう一つは近赤外光領域で用いられるフォトセルである．これは，高抵抗の半導体に，入射する光の強度が増加すると電気抵抗が下がるという性質を利用している．フォトダイオード，CCD といった光起電力効果を利用する検出器も最近増加している．

### 1.d.1　光電子増倍管

光電子増倍管は，真空中で金属に負電圧をかけておき，これに光を当てると電子が放出される光電効果を利用したものである（図 4.1.9）．光電効果で光の粒子性を証明したことでアインシュタインはノーベル賞を受賞した．

光電子増倍管のガラス容器（バルブ）内の真空中に，光電面と 2 次電子放出電極とが納められている．光電面に入射した光は，光電効果で運動エネルギーを持つ電子を光電面から放出させる．これが光電子増倍管への印加電圧で光電面に対して正極になっている増倍電極（ダイノード）に衝突し，2 次電子を放出させる．光電面から 1 光子当たり 1 電子放出された電子は，さらに増倍電極から数倍の 2 次電子を出す．何段もの増倍電極で，衝突のたび毎に電子が増幅され最後に陽極（アノード）に達する(図 4.1.10)．ダイノード 1 段当たりの電子放出比が 4 で 10 段のダイノードで増倍すれば，$4^{10} \fallingdotseq 10^6$ 倍の電子増幅率となる．

光電子増倍管には，真空ガラス容器（バルブ）の側面から光が入るサイドオン型と頭端部から入るヘッドオン型がある(図 4.1.11)．サイドオン型では光が当たると内部金属電極上の光電面から光電子放出が起こる．一方ヘッドオン型では入射ガラス窓内面の光電面から光電子が放出される．大部分の市販分光光度計はサイドオン型を採用している．ヘッドオン型は，本体を試料に近づけ散乱された測定光も有効に捕捉できるので，混濁試料も測定できる分光光度計や，微弱光測定用の検出器として使われている．

光電子増倍管の感度は，使用する光電面により異なる[2]．紫外部にのみ感度があるものや，逆に近赤外の方が

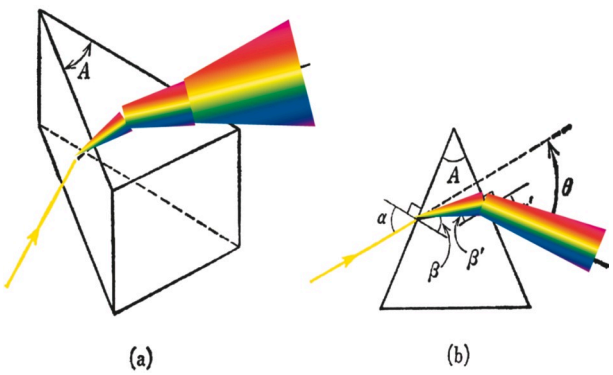



図 4.1.8：プリズムの形状（a）と光路の説明（b）

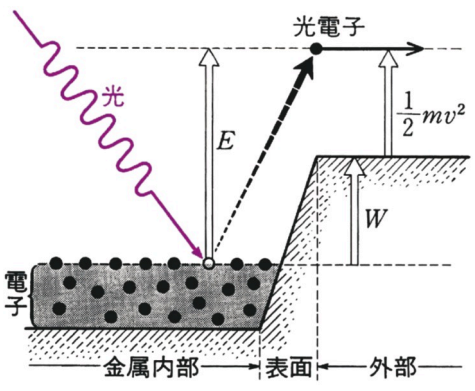



図 4.1.9：光電効果

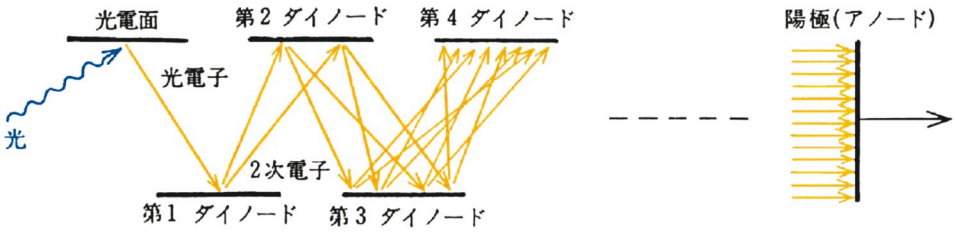



図 4.1.10：光電子増倍管の原理

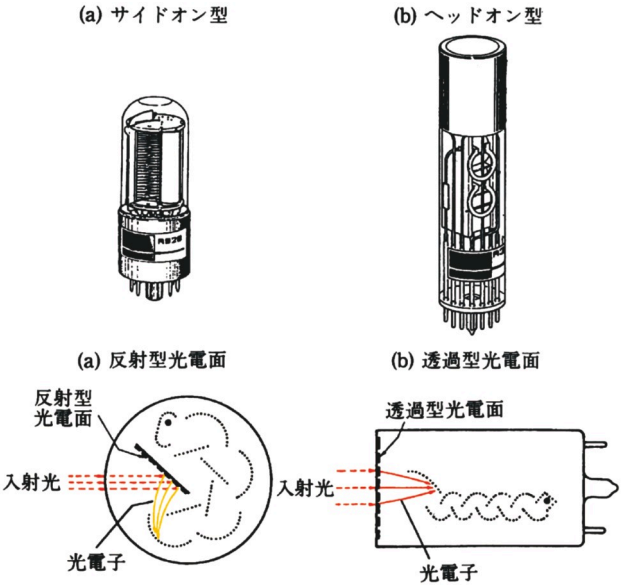



図 4.1.11：サイドオン型とヘッドオン型光電子増倍管の構造

感度が高いものがあり，用途に応じて（蛍光測定等）使い分ける(図 4.1.12)．

### 1.d.2　PbS セル

PbS セルは半導体光検出器の一種で，900 nm 以上の波長範囲のスペクトル測定に用いられる．高純度の半導体または不純物をドープした半導体が，光を吸収したときに電気伝導度が変化することを利用して光の検出を行うものである．光電子増倍管の感度は 900 nm 以上では急速に落ちるため(図 4.1.12)，近赤外部のスペクトル測定にはこの PbS セルが使われる．PbS セルは常温では 2,500 nm まで感度があるので，光合成細菌の吸収スペクトル測定には十分な感度を持つ．

### 1.d.3　CCD 検出器

CCD とは Charge Coupled Device の略で，電荷結合素子と訳される．CCD は半導体の基板表面にシリコン酸化膜のような絶縁膜を薄く貼り付け，その上にさらに多数の電極を配した構造をしている．フォトダイオードを小さくして（必然的に受光面積は小さくなる）多数配列させたというイメージである．各チャンネル（素子）に入力した光は電気量に変換されて蓄積される．この後，各電極間の適当な電位操作により，蓄積電荷を転送して読み出して，各チャンネルの電気量（入射光量）を測定する．CCD を使うと，回折格子（ポリクロメーター）で分離され虹色に広がった回折光全部を一挙に測定できるので，短時間でスペクトルを測定できる．この利点を生かして，時間ごとに次々と変化する試料の吸収スペクトルをほとんどオンタイムで測定でき，HPLC のモニターとしてよく使われている．また，回折格子を回転させないので，分光光度計の駆動部分が不要で，故障が減る．広い波長範囲をカバーするために，通常のイメージセンサより波長領域の広い 200〜700 nm に感度を持つものが使われる．

## 1.e　分光光度計

これまで分光光度計で心臓部をなす各部品について解説してきた．分光光度計の構成は，基本的にこれら 3 つの装置に，増幅器と記録計を繋げたものである．したがって，原理を理解すればこれらを組み合わせて分光光度計を自作する（組み立てる）ことも可能である．本節では分光光度計での測光法と光学系について例を示して解説する．

原理のところで述べたたように，ある溶液の吸光度を測定するためには，試料入射前の光強度 ($I_0$) と，試料透過後の光強度 ($I$) を測定する必要がある．通常の吸収スペクトルの測定では，試料を透過した光 ($I$) と，対照を透過した光 ($I_0$) の強度比を取り，吸光度を計算する．これには二つの方法がある．①まず測定光に対照試料をおいて $I_0$ を測定する．次に試料をおいて $I$ を測定する．この比の対数を取り，吸光度とする．これはいわゆるシングルビームによる測定である．②もう一つは，測定光を二つに分け，一つは対照試料の入ったセルを通った光の強度を測定し($I_0$ に当たる)，もう一つは測定試料の入ったセルを通った光の強度を測定して ($I$ に当たる)，これを一つあるいは二つの検知器で検出して吸光度を求めるものである[3]．これはダブルビーム方式と呼ばれ，自記分光光度計はこの方式が採用されている．検出器は一つの

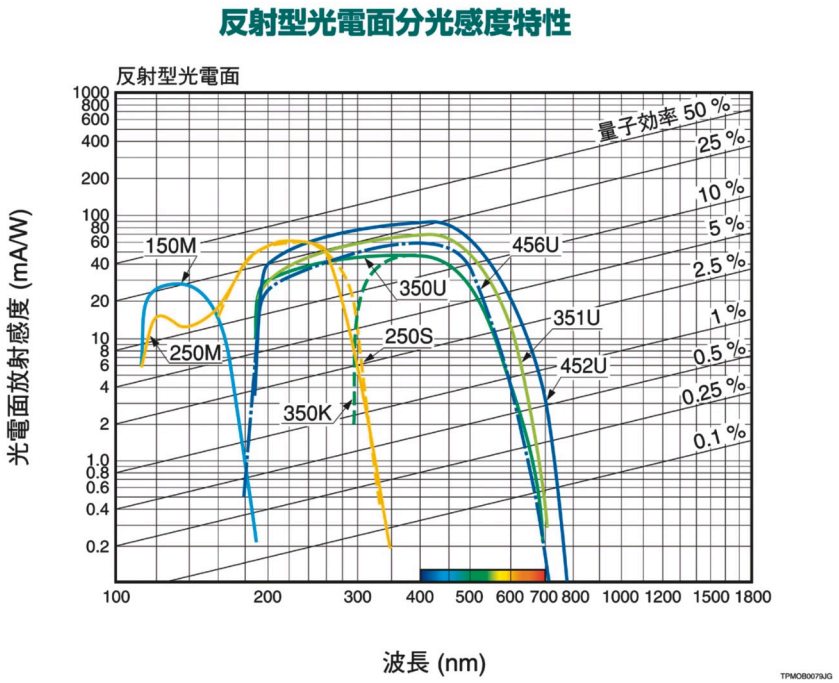



図 4.1.12：光電子増倍管の感度曲線　出典：浜松ホトニクス株式会社(文献（2))

ものが主流である．検出器が一つの場合，試料を透過した光強度に対する信号と，対照を透過した光強度に対する信号を別々に検出しなければならない．これには，モノクロメーターから取り出した単色光のビームを二つに分け，試料と対照とを交互に（時間的に分割して）入射させ，検出器からの信号を試料側と対照側の信号とに分離増幅し，吸光度に変換する方式がとられる．光束の分割は，回転する半円鏡（セクター）とその後ろの固定鏡によって行う(図 4.1.13 a, b, c, d)か，振動鏡(図 4.1.13

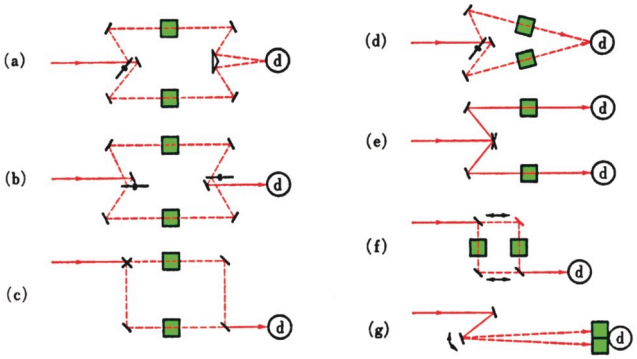



図 4.1.13：ダブルビームの作り方　文献（3）を改変

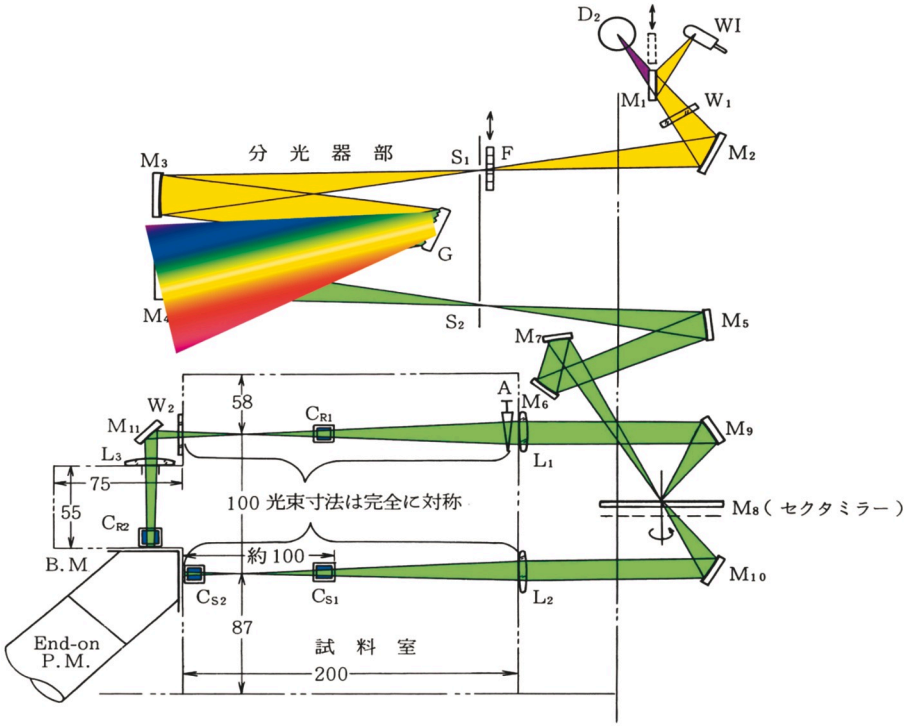



図 4.1.14：島津 MPS-2000 の光学系　文献（4）を改変

g）によって行う．測定光を分割する装置をビームスプリッターと呼ぶ．試料透過後の光はミラーあるいはハーフミラーで光束を揃え，検出器の同じ位置に入射させる．

### 1.e.1　分光光度計の光学系

光電子増倍管を検出器として用いた分光光度計の光学系の一例として島津 MPS-2000 の光学系を図 4.1.14 に示す[4]．測定光源である，重水素ランプ（$D_2$）またはタングステンヨウ素ランプ（WI）からの光は，測定波長範囲にあわせて，ミラーの挿入によって選択される．その後分光器の入射スリットを通って凹面鏡（コンケイブミラー）で平行光にされた後，グレーティング（G）で分光される．この光がもう一つの凹面鏡で出射スリットに集光され，単色光として取り出される．この光はセクターミラーで分割されて試料または対照光として別のキュベットを透過し，一つのヘッドオン型光電子増倍管で測定される．

フォトダイオードアレイ検出器を用いた分光光度計の光学系の原理を図 4.1.15 に示す．これは HPLC や，カラムクロマトグラフィーのモニター用として使われる分光光度計の例である．従来は，分光器で単色光にしてフローセルに通していたため，単一波長での溶出曲線しか取れず，分離された全ての成分を感度よく捉えるための波長を選択するのはほとんど不可能だった．しかしフォトダイオードアレイ検出器を使ったものでは，白色光がフローセルを通った後に分光するので，フローセルを通過する成分の吸収スペクトルを逐次測定していくことができる．そのため，単一波長のモニターでは見逃すような，予想外の波長にピークを持つ成分の検出も可能になった．モニターしたスペクトルを時間に対してプロットしていって，三次元表示を行うことも広く行われている．これはコンピュータの性能が飛躍的に向上したためで，フォトダイオードアレイ型検出器が広く使われるようになった要因の一つである．

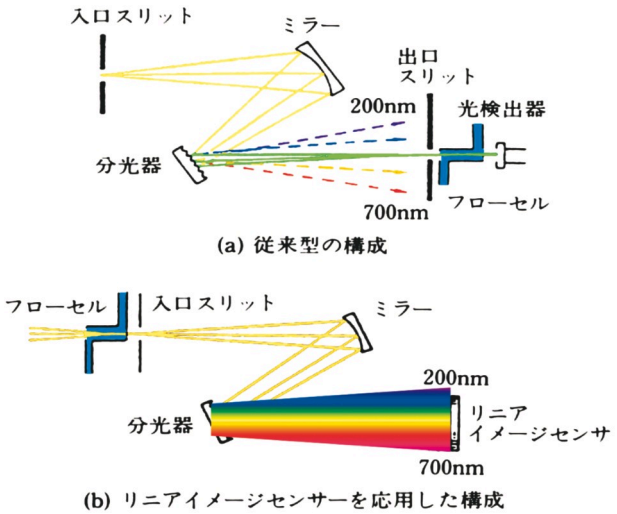



図 4.1.15：クロマトグラフィーモニターに使われる光学系

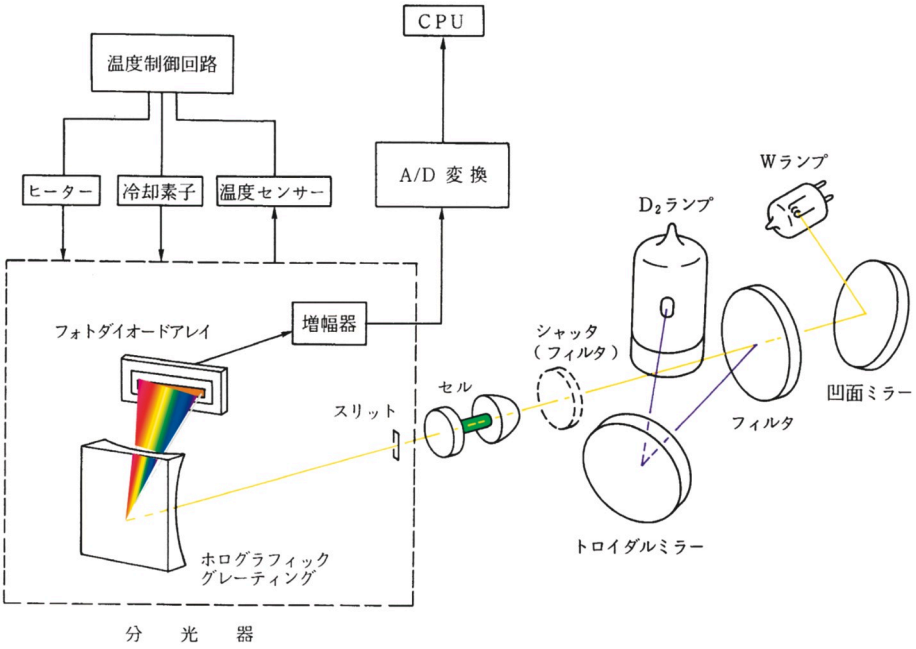



図 4.1.16：フォトダイオードアレイ型モニターの光学系　文献（5）を改変

フォトダイオードアレイ型検出器を使った，実際のモニターの光学系の例を図 4.1.16 に示す[5]．測定光源であるタングステンランプからの光と重水素ランプからの光は，フィルターを兼ねたハーフミラーによって完全に同一の光軸上に載せられ，紫外から可視までの光を含む白色光としてフローセルを通過する．この後，グレーティングにより分光され，512 素子のフォトダイオードアレイに結像させて吸収スペクトルを測定する．

## 1.f　吸収スペクトルの測定

吸収スペクトルを測定する場合，まず試料側，対照側ともに同一試料（通常は水あるいは緩衝液）を入れて，吸光度を波長に対して記録させる．これをベースラインと呼び，原理的には吸光度ゼロの直線が引かれるが，使用しているセルのマッチングが悪かったり，セルの微少な汚れやキズ，ビームが完全に対照になっていないための微妙な光強度，光の純度の違い，検知器への測定光の入射のしかたが同じでない，等で凹凸を示す．大半の市販自記分光光度計はこのベースラインをまず測定器本体のコンピュータに記憶させて，吸光度 0 の値として補正する．次に試料側に測定したい試料を入れて波長をスキャンし，対照試料に対する吸収曲線（ベースライン）から引いて，試料の吸収スペクトルとする．

### 1.f.1　測定誤差

最近の分光光度計は，吸光度表示は全てデジタル表示になっている．表示範囲も 0 ～ 2 または 4 というものもあり，吸光度の値を読み取るのは非常に簡単になっている．分光光度計の検出器からの直接出力は対照および試料を透過した光の強度に比例した電流値である．この時，通常は対照からの透過光の出力（電流値）を 100%$T$ にしておくので，試料からの透過光の出力は透過率に相当する値になる（図 4.1.17 参照）．もし試料を透過率（$T$%）で測定するのなら，測定誤差は測定値全範囲で一定になる．しかし，吸光度の計算法（$A=-\log T=-\log(I/I_0)$）から，吸光度の値は濃度 $c$ に比例するので，$T$ の誤差は一定でも，$-\log T$ の誤差は一定にはならないので，吸光度値は全ての範囲で測定誤差は同じにはならない．

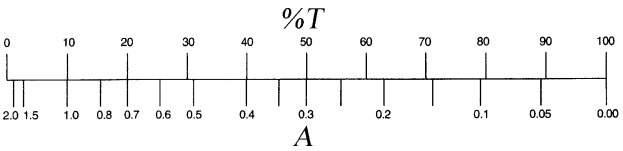



図 4.1.17：透過率と吸光度の関係

いま濃度の相対誤差 $\Delta c/c$ と $\Delta T$ との関係は，

$$A=-\ln T=\varepsilon' cl \quad -\frac{\Delta T}{T}=\varepsilon'\Delta cl \qquad (4.17)$$

となる．ここで，$\varepsilon$'は，常用対数ではなく，自然対数で表したことによる係数を含んでいる．上式の両辺を $\varepsilon' cl$ で割ると，

$$\frac{\Delta c}{c}=-\frac{\Delta T}{T\cdot\varepsilon' cl}=\frac{\Delta T}{T\cdot\ln T} \qquad (4.18)$$

$$\frac{\Delta c/c}{\Delta T}=\frac{1}{T\cdot\ln T}\equiv F \qquad (4.19)$$

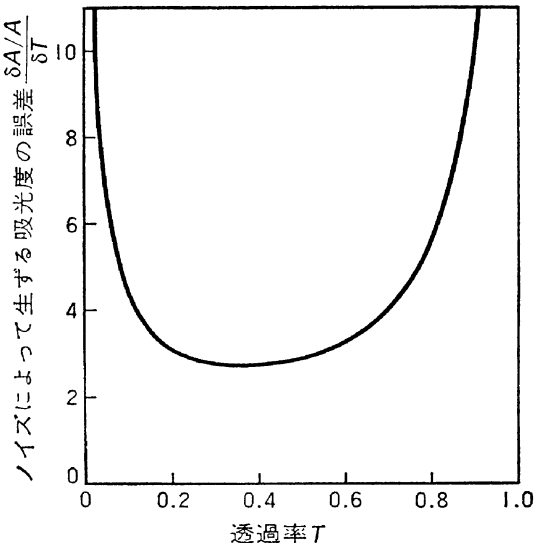



図 4.1.18：測定値の相対誤差

となる．この $F$ を誤差関数といい，透過率の誤差($\Delta T$)を 1 %としたときの $F$ と $T$ の関係は，図 4.1.18 のようになる．この時の極小値は，

$$\frac{d(T\ln T)}{dT}=\ln T+\frac{T}{T}=\ln T+1=0 \qquad (4.20)$$

$$-\ln T=1,\ \ln T=-1,\ T=e^{-1},\ T=0.368 \qquad (4.21)$$

つまり，36.8%$T$（$A$=0.434）のところで誤差が最小となる．このグラフから，吸光度測定を行うときは，誤差の小さい 10〜80%$T$（$A$=0.1〜1.0）の範囲に試料濃度を調整した方がよいことになる．

ただ，最近の分光光度計は透過率の測定誤差がもっと低く抑えられているので，より高濃度部分での測定値もかなり信用できる．

しかし，常に心がけておかねばならないのは，表示される吸光度の値はゼロ付近と高い吸光度の所では測定誤差が大きいことである．デジタルで表示された値をそのまま信用してはならない．

### 1.f.2　迷光の影響[6)]

単色光には，モノクロメーターの構造と，入射および出射スリットの幅に依存した，ある波長幅を持った光が含まれている．また，モノクロメーター内部で乱反射した光が単色光と同じ光軸で出てくることもある．さらに，グレーティングを使って単色光を作る場合，除去しきれない高次光が混ざっている．これら単色光に含まれる，目的としない光を迷光と呼んでいる．測定したスペクトルに迷光の影響が現れやすいのは，紫外部と近赤外部である．それは，グレーティングの回折効率がこれらの領域で悪くなり目的とする単色光の強度が落ちることと，光電子増倍管の感度が下がることによる．また，試料の

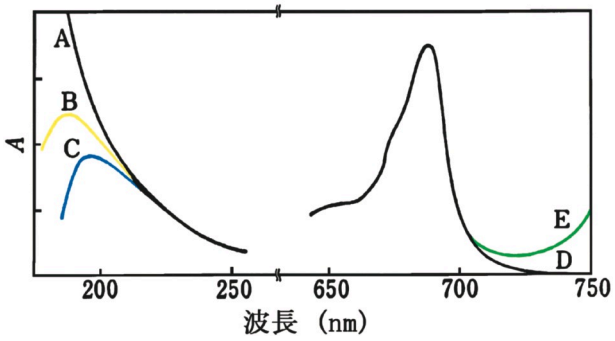



図 4.1.19：吸収スペクトルに対する迷光の影響　文献 (6) を改変

吸収が強い波長でも迷光の影響が出やすい．

紫外部の場合，正しくは図 4.1.19 の曲線 A のような吸収スペクトルを示すものが，長波長の迷光で曲線 B や C のように，あたかも吸収ピークを持つようなスペクトルを示すことがある．また，本来吸収がない 750 nm 付近（曲線 D）で，長波長になるに従って吸収があがるスペクトルになることがある．これは，混入している短波長の迷光を試料が吸収するためである．

また，検量線を作成する場合，ある吸光度以上で検量線が直線から下にずれることがある．これも迷光の影響であることが多い．

迷光の影響を減らすには，迷光の少ないモノクロメーターを使う，測定波長範囲で十分な感度を持つ光電子増倍管を使う，モノクロメーターの入射側に適切なフィルターを入れて高次光を除く，等が対策となる．

### 1.f.3　混濁試料の測定

光合成生物由来の試料には不透明なものが多い．光合成細菌や藻類などの生細胞や単離したチラコイド膜はそのよい例である．通常の分光光度計は透明試料を測定す

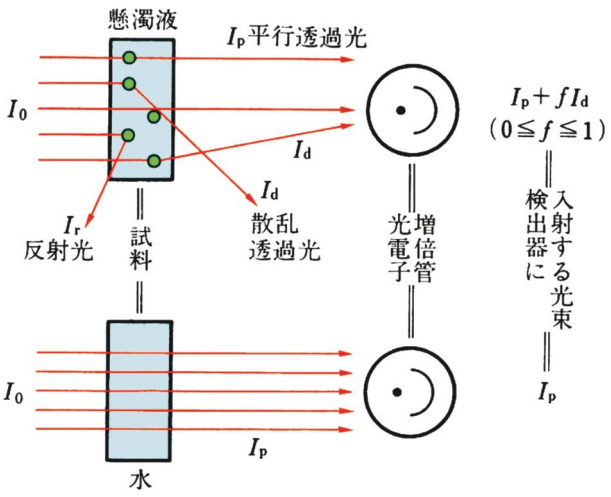



図 4.1.20：混濁試料を透過する測定光

るために作られている．そのため，試料と検出器（光電子増倍管）間の距離が比較的遠い．また，使われている光電子増倍管はサイドオン型なので，受光面積が狭く受光範囲が散乱に影響される．

混濁試料は，母液中に微小な粒子が浮遊している状態と考えることができる．いま，混濁試料に平行な測定光が入射された場合を考える．この時測定光 $I$ について，①試料中の粒子に一度も当たらずに素通りする（$I_p$），②粒子に当たって吸収が起こり，吸収され残った光が前方に散乱される（$I_d$），③吸収され残った光が後方に散乱される（$I_r$）の 3 つの場合が考えられる．実際には，$I_r$ は無視できるので，試料からの透過光の強さは $I_p$ と $I_d$ の和と考えて差し支えない．ここで，$I_p$ はそのまま透過してきた光なので，平行光として検出器に入射される．一方 $I_d$ は散乱光なので，円錐状に後方に散乱されていくことになる．通常の分光光度計は，試料と検出器の間が離れているので，$I_p$ は全量を検出できる（そのように設計されている）が，$I_d$ はその一部分のみが検出されるだけである．散乱光強度 $I_d$ にかかる係数 $f$ は，分光光度計の検出器（光電子増倍管）が捉える散乱光の割合で，試料と検出器間の距離が長くなると $f$ は距離の自乗に反比例して急激に小さくなる．普通の分光光度計の場合，この値は数百分の 1 のオーダーになるため実質的に $fI_d$ はゼロで，吸光度 $A$ は試料に吸収されたかどうかということとは無関係に，$I_0/I_p$ で決定されることになる．さらに，$I_0/I_p$ は波長にほとんど依存しないので，波長による変化がほとんど見られないスペクトルとなってしまう．

懸濁試料の吸収スペクトルが正しく測定できないのは，試料によって測定光

$$A=-\log\frac{I}{I_0}=\log\frac{I_0}{I}=\log\frac{I_0}{I_p+fI_d} \qquad (4.22)$$

ここで，$I=I_p+fI_d$，$0\leq f\leq 1$ である．

が散乱されるためである．その解決策としては，①対照試料の測定光も同じように散乱させる（$I_0$ も同じような散乱効果を与える）か，②検知器を試料に密着させる（$f$ の値を 1 に近づける）．①には，積分球を使う方法と，オパールグラスを使う方法がある．②には，このために設計された特殊な分光光度計が必要となる．

① オパールグラス法[7)]

オパールグラス法は，通常の分光光度計を使って比較的簡便に吸収スペクトルを測定する方法である（図 4.1.21）．オパールグラスは不透明に近い散乱板で，平行光（対照試料からの測定光）も，散乱光（混濁試料からの測定光）も区別なく一様に散乱させるので，試料，対照とも同じ程度に混濁した試料が入った状態で測定することとほぼ同じになる．したがって，検出器では対照側，試料側ともに入射光の一部のみが測定され，その結果試料の吸収スペクトルにほぼ忠実な測定光の信号が得られ，懸濁試料の吸収スペクトルが測定できる．図 4.1.22 の曲線Ａは，通常の測定法でクロレラの懸濁液を測定した場合で，特徴的な吸収スペクトルが得られない．オパールグラスを対照，試料両側に挿入して測定すると曲線Ｂのスペクトルが得られる．これはクロレラ懸濁液から有機溶媒で色素を抽出した，透明な溶液の吸収スペクトル（曲線Ｃ）とよく似ている．普通の分光光度計を使って混濁試料の吸収スペクトルを測定する際には，オパールグラスを使うのが有効であることが分かる．

問題点としては，オパールグラスによって対照光も散乱されるため，光電子増倍管に入射する光量がかなり低下する点である．対照光が絞られると，感度を上げるために光電子増倍管への印加電圧が高まり，それに伴うノイズが多くなる．特に光電子増倍管の感度が低下する短

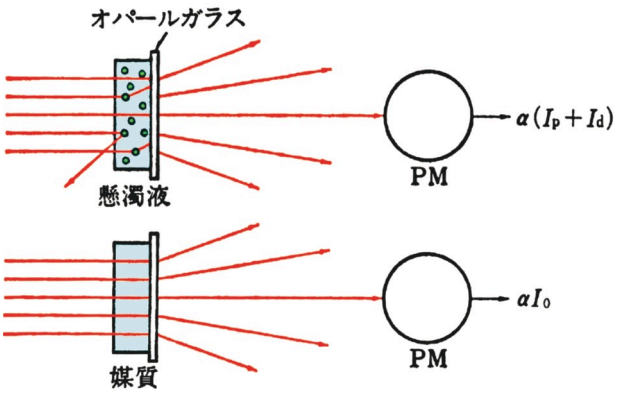



図 4.1.21：オパールグラス法の原理

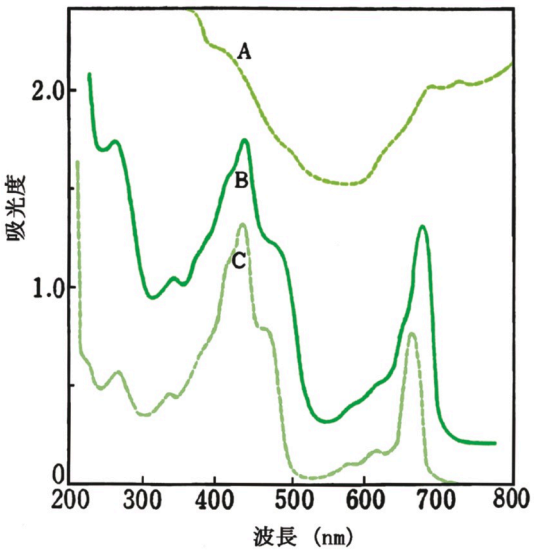



図 4.1.22：オパールグラス法による測定例　文献 (7) を改変

波長側でその傾向が目立つようになる．

② 検出器密着法[8)]

もう一つの解決法として，散乱光も捉えて吸収スペクトルを測定する方法である．このために光電子増倍管を試料セルに密着させて，散乱光をほとんど全て捉える方法が工夫されている．これには，受光面が広く，かつ平面になっているヘッドオン型光電子増倍管が使われる．この場合，対照は通常透明な溶液を使うので，対照光は光電面の一部だけに強く入射するので，その場所だけが激しく劣化する危険性がある．また，なるべく広く光電面を使う方が場所による感度差が少なくなるので，石英板をスリにして（磨りガラスと同じだがガラスは紫外線を透過しないので石英ガラスを使う），セルの後ろまたは光電子増倍管の前に置いて測定光を散乱させて測定するのが普通であるが，これでも問題は完全には解決されない．これらの問題をある程度解決する方法として，光散乱させる磨り石英板と光電子増倍管の間をある程度離して測定するという工夫がなされている（図 4.1.23）．このような光学系の例を，図 4.1.14 に示した．

### 1.f.4 低温吸収スペクトル

紫外・可視領域における吸収スペクトルは，測定分子の，基底状態から励起状態への電子状態の遷移を測定するもので，電子スペクトルに相当する．

ところで，分子が持つ内部エネルギーには，回転，振動，電子の三種類がある．紫外―可視吸収スペクトルの測定はそのうちの電子エネルギーの遷移を測定するものだが，それぞれの電子状態はその準位内に振動と回転準位を含む．振動準位間の遷移は室温程度の熱エネルギーで容易に励起されるので，基底状態にある分子の電子状態中にも，広い振動準位の分布がある．これを低温（たとえば 77 K）に冷却すると，電子の多くは振動準位の基底状態または第 1 励起状態に落ちる．光の吸収による電子状態の遷移も，室温では様々な振動準位から遷移するため，吸収スペクトルの半値幅は広く，吸収ピークは低くなる（図 4.1.24 左）．一方低温では，低い振動準位に多くの電子が存在している状態から，光の吸収で励起状態に遷移するので，半値幅が狭く，ピークは高くなる．また，低い振動準位から励起状態に上げるために，室温より多少高いエネルギーが必要になり，吸収ピークは室温より短波長側にシフトする（図 4.1.24 右）．したがって，低温で吸収スペクトルを測定すると吸収型（吸収フォーム）の違いが室温より明瞭になる．

実際に葉緑体の吸収スペクトルの測定例を図 4.1.25 に示す[9)]．室温では 680 nm 付近に一つのなだらかなピークを示すだけだが，液体窒素温度 77 K ではピークが鋭くなり，いくつかの肩が見られるようになり，同じクロロフィル a でもタンパク質に結合した状態ではその吸収ピークがいくつかの型（クロロフィルフォーム）に分かれるのが見て取れる．

低温といっても，数 K から 273 K（0°C）まで広いが，液体窒素温度（77 K）またはドライアイス ── メタノー

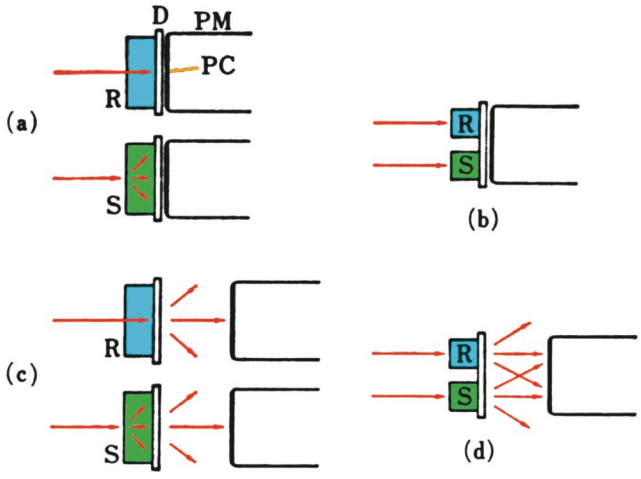



図 4.1.23：検出器密着法　文献（8）を改変

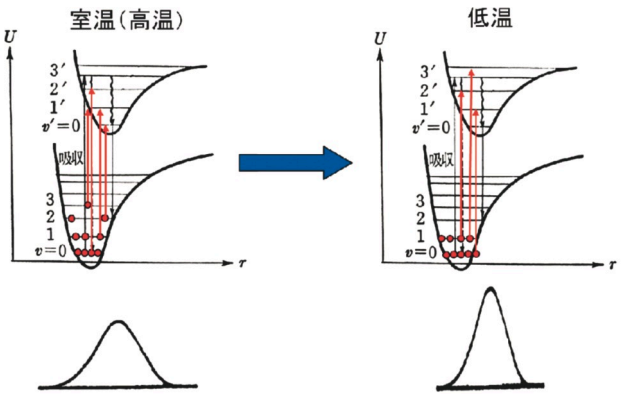



図 4.1.24：室温と低温における分子のエネルギー準位と遷移および吸収スペクトル

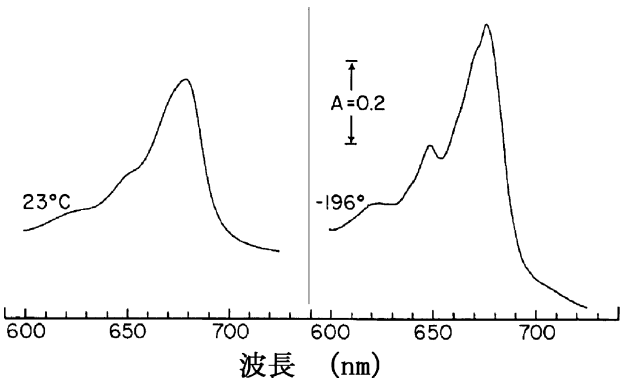



図 4.1.25：葉緑体の室温と液体窒素温度での吸収スペクトル　文献（9）を改変

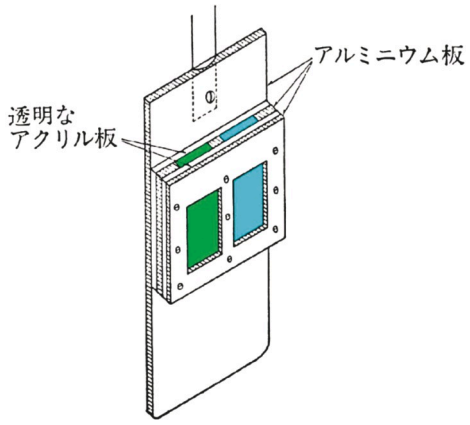



図 4.1.26：低温スペクトル用サンプルホルダー（1）

ル温度（−79℃）での測定が簡便なためよく用いられる．本項では，液体窒素温度での吸収スペクトル測定に必要な付属装置について述べる．液体ヘリウム温度または寒剤のみでは到達できない温度での測定には通常クライオスタットが用いられる．この装置はやや高価で，複雑である．生体試料の低温スペクトル測定の詳しい解説は他の成書[10]を参照していただきたい．

液体窒素温度での測定には専用のデュワー瓶（魔法瓶）を使用する．普通のデュワー瓶は保温性を上げるためにメッキが施されているが，吸収スペクトル測定用では測定光の通路部だけ窓状，または帯状にメッキしていないものが用いられる．

サンプルホルダーは，図 4.1.26 に示したようなものが一般的である．図 4.1.27 はサンプルホルダー全体を横から見た図である[11]．これは，アルミ板に四角く窓を開けたものに，サンプル保持用のアルミ枠をアクリル板で挟んだ構造になっている．サンプルはこのアクリル板の間の隙間に注入して凍らせる．試料を凍らせるには，液体窒素を入れた別のデュワー瓶にサンプルホルダーを静かに入れるだけでよい．最初は液体窒素が沸騰するが，全体が低温になるとおさまるので，測定用のデュワー瓶に移して測定を開始する．低温スペクトル測定装置の光学系の一例を図 4.1.28 に示す[11]．

測定用のデュワー瓶にも液体窒素を入れておき，サンプルホルダーのアルミ板がそれに浸るようにする．通常は窓の下あたりまで液体窒素を入れる．試料を全部液体窒素に漬けると，気化した窒素の泡が上がり吸光度が安定しない．

試料はグリセロールやショ糖を含む場合がある．このような試料を急速に凍らせると透明なまま凍るが，大きなひび割れができる．これをそのまま測定に用いると，測定中にさらにひび割れができてベースラインが途中で

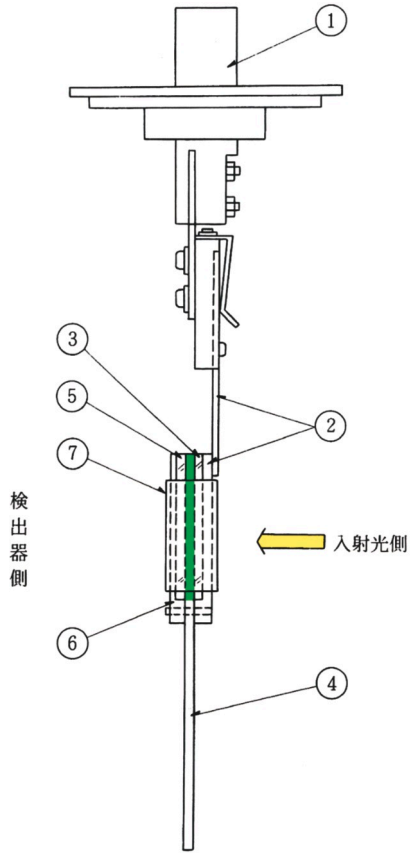



図 4.1.27：低温スペクトル用サンプルホルダー（2）文献（11）を改変

飛んだり，吸収スペクトルが異常になったりする．これを避けるために，試料を−50℃ぐらいまでいったん暖める．すると突然白濁し，氷の微結晶ができて試料がオパールグラス状になり，安定した状態になる．この状態から再び冷却して測定する．また，この微結晶のために測定光の多重吸収が起こり，吸光度が増加する利点もある．（クライオスタット中や熱伝導などで，55％以上のグリセロール存在下でゆっくり凍らせると透明な氷ができる）．スペクトル測定後はサンプルホルダーを水道水の中に入れて融かす．その後洗瓶でよく洗い，細く切った濾紙でセルに残った水を除き，次の測定に用いる．

窓剤として使うアクリル板は液体窒素に浸しても割れたりしないので都合がよい．しかし，紫外線を透過しないので紫外部の吸収スペクトルは測定できないことに注意する．分解可能なサンプルホルダーは，その日の測定が終了したら分解して乾燥させておく．

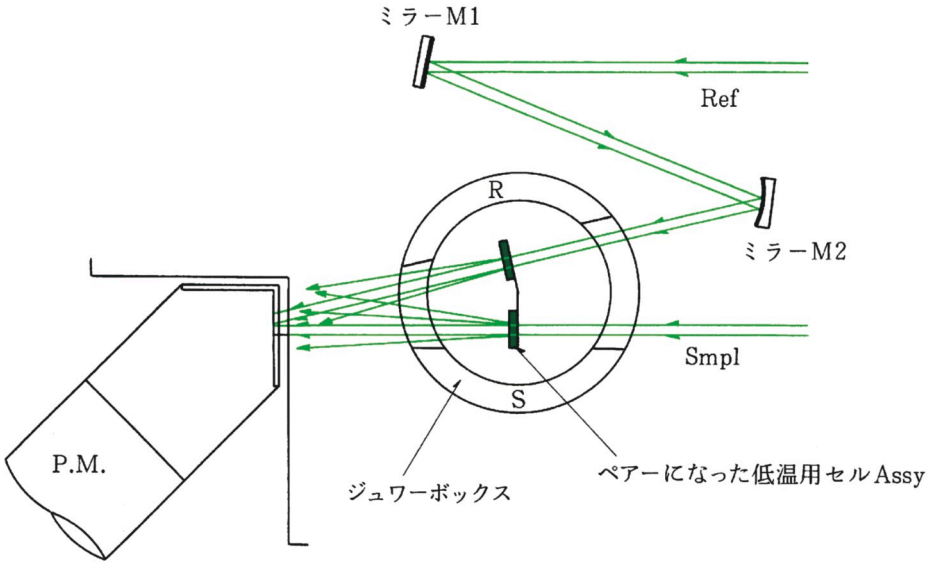



図 4.1.28：低温スペクトル測定装置の例　文献（11）を改変

## 1.g　作用スペクトルと量子収率

### 1.g.1　原理

光合成に限らず，光照射で何らかの反応が起こる場合，一定の光量（光量子またはエネルギー）で起こる反応量または反応速度を，照射光の波長に対してプロットしたものが作用スペクトルである．フィトクロームのように，生体中での光受容物質の量が極端に少なく，吸収スペクトルでは検出できない場合でも，作用スペクトルの測定で，その光受容物質の吸収スペクトルを推定することが可能である．また，光合成系のように，多数の色素（吸収フォーム）によって吸収された光が光化学反応を起こす場合，色素間のエネルギー移動や光化学系Ⅰ，Ⅱの関与を解析する手段としても有効な手法である．

ある反応系に，単色光の波長 $\lambda$ の光量子を単位時間あたり $N_0$ 個照射し，測定対象が $N$ 個の光量子を吸収したとする．この照射を時間 $t$ だけ行い，反応量 $P_\lambda$ が得られたとする．このとき，波長 $\lambda$ における反応は

$$P_\lambda/(N_0 t) \qquad (4.23)$$

で表され，作用スペクトル（action spectrum）はこれの，波長 $\lambda$ を変えたときの関数として定義される．

作用スペクトルの測定は，光受容物質による光の吸収が反応全体を律速する条件で行わなければならない．つまり，反応は，与えた光強度と照射時間に比例する条件が必要である．したがって，試料はそのような条件を満たすような希釈されたものを用いる必要がある（ただし，逆に光が全て吸収されるように濃い試料を用い，照射した単色光の光強度（光量子）と反応量から作用スペクトルを測定する方法もある）．波長 $\lambda$ の光を照射したとき，その反応量 $P_\lambda$ と吸収された全光量子 $N\cdot t$ は比例関係にある．このときの比例定数を $\phi$ とすると，

$$P_\lambda = \phi \cdot N \cdot t \qquad (4.24)$$

と表すことができる．この比例定数 $\phi$ を量子収率（quantum yield）と呼ぶ．すると，作用スペクトル測定における波長 $\lambda$ の反応は，

$$P_\lambda/(N_0 t) = \phi \cdot N \cdot t/(N_0 t) = \phi \cdot N/N_0 \qquad (4.25)$$

と表せる．したがって，作用スペクトルは量子収率 $\phi$ と吸収率 $N/N_0$ の積についての波長依存性と考えることができる．

ここで，量子収率 $\phi$ は光受容物質に吸収された光量子当たりの反応（分子）数であったので，一種類の光受容物質のみが反応する場合には $\phi$ の値はその光受容物質の吸収波長全域に渡って一定の値をとるということに注意する．つまり，ある一種類の色素が光を吸収して反応を起こす場合，標的色素が光を吸収して反応するのなら，どの波長の光であってもその効率は同じであるということである．したがって，試料濃度が高く，$N/N_0$ が 1 に近いようなところでは，量子収率が見かけ上波長に依存するような測定結果が得られてしまう（もちろん光合成系のように複数の色素が反応に関与していたり，色素間のエネルギー転移の効率が最終的な反応量に反映されるような場合は，量子収率は実際に照射波長に依存する）．

通常作用スペクトルは吸収スペクトルに関連させてプ

ロットされる．式 4.25 は，物質の吸収率 $N/N_0$ の関数となっていた．通常使う吸光度は透過率 $T$ の常用対数をとったものである．透過率は，

$$T=1-N/N_0 \tag{4.26}$$

で表されるので，光受容物質の吸光度を $A$ としたとき，

$$A=-\log T=-\log(1-N/N_0) \tag{4.27}$$
$$-A=\log(1-N/N_0) \tag{4.28}$$
$$-A=\ln(1-N/N_0)/\ln 10 \tag{4.29}$$
$$\exp(-A\cdot\ln 10)=1-N/N_0 \tag{4.30}$$
$$N/N_0=1-\exp(-2.303\,A) \tag{4.31}$$

となる．いま，$N/N_0$ と $A$ が十分に小さければ，

$$N/N_0=2.303\,A \tag{4.32}$$

と表せる．したがって，

$$P_\lambda/(N_0\cdot t)=\phi N/N_0=2.303\phi\cdot A \tag{4.33}$$

となり，作用スペクトルを光受容物質の吸収スペクトルと対比できる．この関係式を満たす測定には，試料濃度を低く抑える必要がある．試料濃度が高いと作用スペクトルは吸光度ではなく，吸収率で表されるスペクトルに近づき，波長依存性は不明瞭になる．

### 1.g.2　作用スペクトルの測定

作用スペクトルの測定には，反応を測定するための装置に加え，光を照射するための光源，そこから単色光を取り出す器具，光量子または光のエネルギーを測定する装置が必要になる．

光源は，連続スペクトルを持つタングステンランプや，白熱球，またはキセノンランプがよい．

単色光を取り出す器具としては分光器が考えられるが，これは波長精度はよいものの，どうしても光強度が低くなる．また，適当なフィルターの組み合わせで高次光を除かなければならないという欠点がある．そのため，波長精度は落ちるが，干渉フィルターを用いて測定することが多い．干渉フィルターは 10 nm 程度の半値幅を持つものが一般的である．従来の干渉フィルターは，得られる強度は強いが，透過する波長の幅が広いという欠点があった．しかし最近は金属薄膜を多重蒸着させた，透過率が高く，かつ切れのよい干渉フィルターがあり，高い波長精度で単色光を取り出すことができる．

干渉フィルターはその性質上，照射光をフィルターに対して垂直に当てる必要がある．斜めに入射すると透過波長が変わるので，注意が必要である．また，干渉フィルターといっても高次光を通す「窓」が長波長側（近赤外から赤外）に出現するので，熱線カットフィルターや水の層を通して除去する．

そのほかに，最近では発光ダイオードで，安価，容易に単色光光源を作ることが可能になった．青色発光ダイオードも実用化され，青から赤まで，ほぼは全波長範囲に渡ってそろえることができる．青色部はまだ高輝度のものは得られていないが，2 〜 3 個合わせて使えば問題はない．赤色部では超高輝度のものまで入手できる．680 nm 以上の波長範囲の発光ダイオードはあまり多くない．

LED 光源には，直流安定化電源が一つあれば十分である．これに抵抗を入れ，定格電圧で発光させればよい．平行光や収束光を作るにはそれなりのランプハウスとレンズがいるが，円錐形にした厚紙の内側にアルミホイルを貼ったものでも十分使用できる．

発光ダイオードは定格電圧以下でも発光が始まり，電圧を上げる輝度が上がり，発光ピークが 1〜2 nm，場合によっては 5 nm ほどシフトすることがあるので注意が必要である．蛍光光度計の試料室に発光ダイオードを置き，励起光を遮断してスペクトル測定すれば発光スペクトルが得られるので，正確な発光波長を求めておくことを勧める．

さらに，分光器を使うにせよ，干渉フィルターを使うにせよ，装置の隅をまわって迷光が入り込むことがあるので，これを除くように注意しなければならない．

光量測定には，専用の熱電対が用いられてきた．これは，熱電対を何段にも重ね，受光部内部を黒くして光を全て熱に変換して測定するもので，専用の道具（サーモパイル）として購入できた．波長感度特性が波長によって変わらず，入射光が全て熱に変わるという前提で，温度上昇に比例した起電力が生ずるのでこれを記録すればよい．たいていは感度の校正値が付いてくるので，エネルギーに換算する．赤外線を十分に除き，照射波長の光だけをサーモパイルに導入する．得られる値はエネルギーなので，測定した波長ごとに光量子数に換算する必要がある．

最近は，照射光強度を直接光量子数として計測換算できる光量子センサーが市販されている．今のところ可視光領域でのみ測定できるが，センサーとしては，感度にあまり波長依存性のないフォトダイオードを使用している．

実際の測定に際しては，測定条件で反応が飽和しないことに注意する．特定波長（通常は反応が一番大きく出ると予想される波長）を選び，時間当たりの光強度 $N_0$ の光を一定時間照射して反応量（$P$）を測定する．このとき，

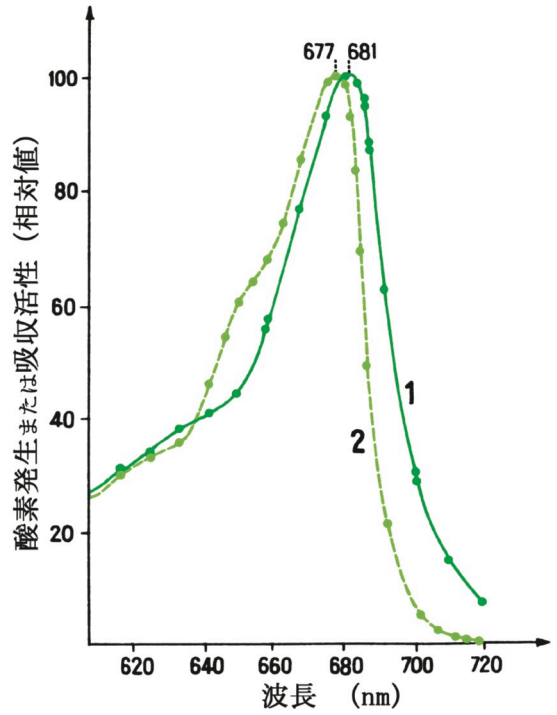



図 4.1.29：異なるバックグラウンド光を照射したときの，酸素発生または吸収に対する作用スペクトル　文献(12)を改変

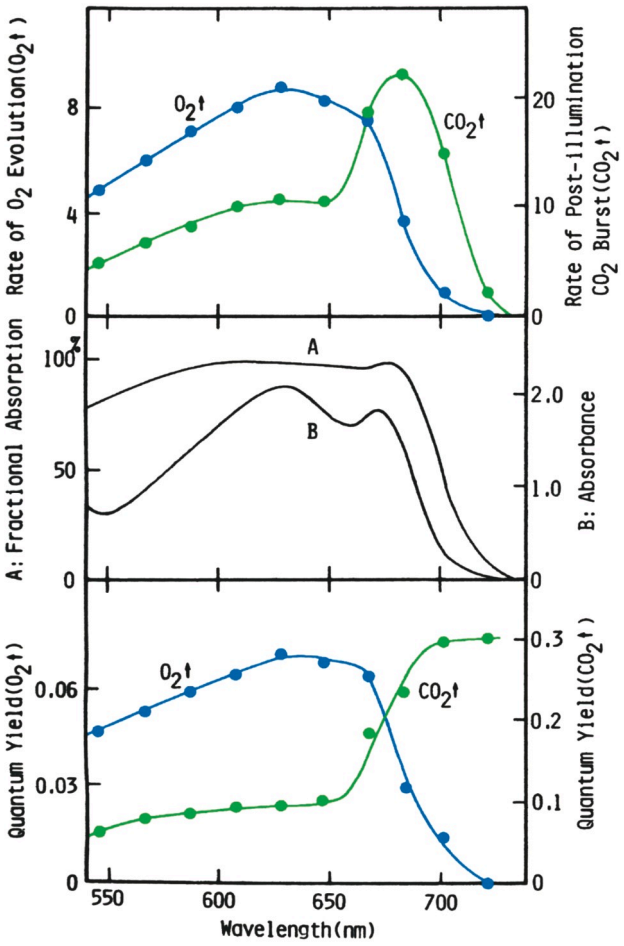



図 4.1.30：ラン藻細胞における酸素発生と重炭酸イオンの取り込み量に対する作用スペクトルと，それらの量子収率　文献（13）を改変

反応量が照射時間 $t$ に比例していることを確認する．同時にいくつかの異なる光量を選んで測定し，反応が十分大きく，かつ比例関係にある光量を選んでおく．この条件が見つかれば，$N_0$ を一定にして $t$ を変化させても，逆に $t$ を一定にして $N_0$ を変化させても同じ結果が得られるはずである．このような比例関係が満たされていれば，波長 $\lambda$ を変えて試料を一定時間照射し，得られた反応量 $P_\lambda$ をプロットすれば作用スペクトルが得られる．厳密に作用スペクトルを求めるのなら，$P=\alpha\cdot N_0\cdot t$ の比例関係から $\alpha$ を波長に対してプロットする．

作用スペクトルの例を，図 4.1.29 に示す[12]．これは，ホウレンソウの葉緑体にバックグラウンド光を照射しておき，波長の異なる，90 Hz で変調した作用光を照射したときの活性の変化量を，波長に対してプロットしたものである．

曲線 1 は，系 II 光（650 nm）をバックグラウンド光として照射しながら，波長の異なる変調光を照射したときに観測される，メチルビオローゲンの還元活性（光化学系 I の活性）を，波長に対してプロットしたものである．活性のピークは 681 nm にあり，700 nm でも高い活性を示すことが分かる．一方曲線 2 は，720 nm のバックグラウンド光を照射しながら，波長の異なる変調光を照射したときに見られる酸素発生量（光化学系 II の活性）を，波長に対してプロットしたものである．この場合は，より短波長側の 677 nm にピークが見られ，700 nm では活性はほとんど見られない．また，650 nm に光化学系 II の集光性クロロフィルタンパク質の寄与による明瞭な肩が見られる．

両者の作用スペクトルの形は，分離された光化学系 I，II のそれぞれの吸収スペクトルとよく一致している．

作用スペクトルの測定は十分な光強度を持つ単色光を作り出すことが困難なため，あまり行われてこなかった．しかし，自然科学研究機構基礎生物学研究所にある共同利用機器，大型スペクトログラフは強力で照射面積の広い単色光を照射できる．作用スペクトルの測定設備を整える費用や手間がなければ，これを利用するのも一つの手である．

### 1.g.3　量子収率の測定

量子収率 $\phi$ は，反応量（速度）$P_\lambda$ を，吸収された光量子数 $N$ で割ることで求められる．$N$ の測定は，反応系に照射した光の光量子数 $N_0$ と，反応液に吸収されずに透

過してきた光の光量子数（$N_0-N$）を測定すれば，求められる．しかし単色光を照射して測定する場合は，$N_0$ だけを測定し，$N/N_0$ は，分光光度計でスペクトル測定して求めても同じである．

作用スペクトルの場合は相対値として測定して問題はない．しかし，量子収率は絶対値の測定になるので，光強度の測定は精確に行う必要がある．

一例として，ラン藻を用いた量子収率の測定結果を示す．ラン藻は主な光合成色素としてクロロフィル $a$ と，620 nm 付近にピークを持つ青色の可溶性タンパク質であるフィコシアニン類，および黄色〜橙色の複数種のカロチノイドを持つ．このうち，クロロフィルは主に光化学系Ⅰに属し，フィコシアニンは光化学系Ⅱに属す．

ラン藻は炭酸固定のための無機炭素（$CO_2$，$HCO_3^-$）を，光のエネルギーを使って細胞内に取り込む．この反応の作用スペクトルとそれらの量子収率を測定したのが，図4.1.30 である[13]．なお，照射光は干渉フィルター（半値幅 10〜15 nm）を用いて単色光化している．

上段の図は酸素発生で測定した炭酸固定反応と，光照射で細胞内に蓄積される無機炭素の量についての作用スペクトルである．酸素発生反応の作用スペクトルは 600〜700 nm に広いピークを持ち，フィコシアニンの吸収スペクトルとよく一致している．これは，炭酸固定反応までを含む全体の光合成反応が光化学系Ⅱ（フィコシアニンが主要な集光色素）の反応で律速されていることを示している．一方無機炭素の取り込みは酸素発生のそれとは全く異なり，684 nm にピークを持つクロロフィルの吸収スペクトルの形とよく一致しており，この反応は専ら光化学系Ⅰによって進行することを示す．

中段の図は使用したラン藻細胞の吸収スペクトル（B）と吸収率（$N/N_0$）スペクトル（A）である．原理のところで述べたように，測定試料が希薄な場合は吸収スペクトルに係数を掛けた値で反応量を割れば量子収率が得られるが，図に示した試料は吸収率が 1 に近いため，吸光度ではなく，吸収率（中段曲線 A）で割って量子収率を求めている．

こうして得られた量子収率が下段の図である．酸素発生の量子収率は 630〜670 nm でほぼ一定の最大値をとり，短波長側では緩やかに低下していく．この低下は作用スペクトルの低下よりも緩やかである．もし短波長側の吸収もフィコシアニンによる寄与が非常に大きければ高い値のままであるはずであるが，これらの波長域ではクロロフィルによる吸収の寄与が大きくなるので，その分だけ量子収率が低下することになる．また，長波長側はクロロフィルによる吸収が圧倒的に大きくなることで量子収率が急激に低下している．他方，無機炭素の蓄積に対する量子収率は，650 nm より短波長側では低い一定の値を示すが，それより長波長側では急激に上昇し，700 nm 以上で最大値を示す．これは，上で述べたように無機炭素の蓄積は専ら光化学系Ⅰによって進行し，光化学系Ⅰは主にクロロフィルが（フィコシアニンではなく）その集光色素系を構成しているためである．フィコシアニン類の吸収の寄与が全くない 700 nm 以上の波長領域ではクロロフィルのみが光を吸収するため，高い量子収率を示す．

ここで注意しなければならないのは，量子収率が高いからといって反応量が大きいとは限らないことである．中段の吸収・吸収率スペクトルが示すように，長波長側では試料に光を照射してもほとんど吸収されない．反応量は吸収された光量に比例するので，吸収率が低ければ当然反応量も小さい．したがって，長波長光を照射した場合，量子収率は高いが，実際の反応量は少ない．

## 参考文献


1）村山精一，「分光測定入門」，中原勝巖編，日本分光学会測定法シリーズ 13，学会出版センター，1987，P.74

2）浜松ホトニクス株式会社　光電子増倍管及び関連製品カタログ

3）柴田和雄，「微少スペクトル変化の測定　生体試料を中心にして」，井上頼直編，日本分光学会測定シリーズ 4，学会出版センター，1983，P.11

4）島津製作所　MPS-2000 取扱説明書

5）島津製作所　SPD-10A　取扱説明書

6）柴田和雄，「微少スペクトル変化の測定　生体試料を中心にして」，井上頼直編，日本分光学会測定シリーズ 4，学会出版センター，1983，P.13

7）K. Shibata, Methods of Biochemical Analysis, ed. D. Glick, Interscience Publ. Vol. **7**, 1959, P.77

8）柴田和雄，「微少スペクトル変化の測定　生体試料を中心にして」，井上頼直編，日本分光学会測定シリーズ 4，学会出版センター，1983，P.22

9）Butler, W. L. and Hopkins, D. W., Biochim. Biophys. Acta **12**, 1970 439

10）飯塚哲太郎「微少スペクトル変化の測定　生体試料を中心にして」，井上頼直編，日本分光学会測定シリーズ 4，学会出版センター，1983，P.99

11）島津製作所　MPS-2000 用低温スペクトル測定ユニット取扱説明書

12）Joliot, P. Methods Enzymol. ed. A. San Pietro, Academic Press, Vol. **24**, P.123

13）Ogawa, T. and Inoue, Y. Biochim. Biophys. Acta **724**, 1983, P.490

# 2．分光測定法
## a．蛍光

秋本　誠志[1)]

吸収とは異なり蛍光は電子励起状態にある物質のみから得られるため，蛍光分光法は光合成系における励起エネルギー移動など電子励起状態が関与する現象の観測に適している．本章では，蛍光分光法についての概略を述べる．

## Fluorescence spectroscopy

Seiji Akimoto

Fluorescence spectroscopy is one of the most important techniques to detect excitation relaxations within a pigment molecule and excitation energy transfer among pigment molecules. In this chapter, fluorescence emission and excitation spectra, fluorescence anisotropy, and time-resolved fluorescence are described.

### 2.a.1　蛍光発光スペクトル

発光は，電子励起された物質が光を発しながら電子基底状態に緩和する過程である（図1）．比較的寿命が短く一重項間の遷移で発せられるものを蛍光と呼び，比較的寿命が長く三重項 ── 一重項間の遷移で発せられる燐光とは区別される．ある固定された波長で物質を励起し，そこから発せられる蛍光の強度を観測波長の関数として表したものを蛍光発光スペクトルと呼ぶ．単に蛍光スペクトルと略される場合が多い．

蛍光は，振動緩和，内部転換，項間交差などの緩和過程と競合して起こる．最低電子励起状態の寿命が振動エネルギーの緩和時間よりも十分に長い色素分子（クロロフィルやフィコビリンなど）では，蛍光は最低電子励起状態の振動基底状態から発せられるもの（図1，赤矢印）が主成分となり，定常蛍光スペクトルの形状は励起波長依存性を示さない．カロテノイド系分子[1)]やポルフィリン系分子[2)]などでは，高電子励起状態からの蛍光スペクトルも観測される．

液体窒素や極低温クライオスタットなどを用いて低温にすると蛍光スペクトルのバンド幅は鋭くなり，色素分子の電子遷移エネルギーや分子間相互作用に関する詳細な検討が可能となる．例えば，室温で植物やシアノバクテリア中のクロロフィル *a* 蛍光を観測すると（図2），光化学系Ⅰの蛍光は弱く，680 nm 近辺に極大を持つ光化学系Ⅱの集光性クロロフィル *a* からの蛍光が主に観測される．一方，液体窒素温度（−196°C，絶対温度 77 K）まで冷却すると，光化学系Ⅱのクロロフィル *a* からの蛍光バンドが 685 nm 近辺と 695 nm 近辺に，光化学系Ⅰのクロロフィル *a* からの蛍光バンドが 715–735 nm に観測される[3)]．685 nm と 695 nm の2つのバンドは，光化学系Ⅱコアアンテナ CP43，CP47 サブユニットに存在する低エネルギーのクロロフィル *a* からの蛍光，また，715–735 nm のバンドは，光化学系Ⅰ複合体や隣接する光化学系Ⅰアンテナ色素タンパク質複合体（LHC Ⅰ）に存在する相互作用の強いクロロフィル *a* からの蛍光に帰属されている（これらのクロロフィル *a* は吸収帯についても長波長にシフトする）．光化学系Ⅰ蛍光は光合成生物ごとに

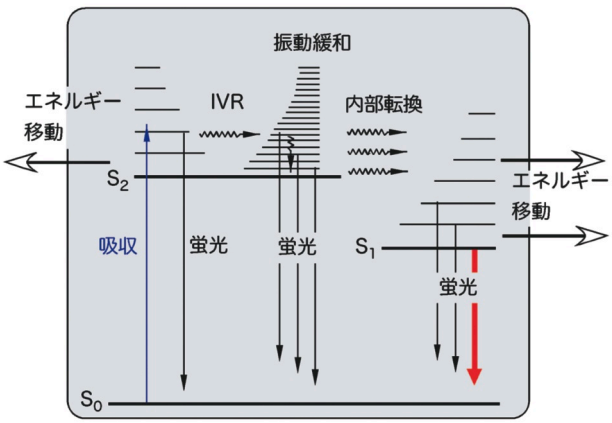



**図1**：光励起後の緩和過程の概略
分子が光を吸収した後，分子内振動エネルギー再分配（IVR），振動緩和，内部転換，励起エネルギー移動過程などが起こる（この他にも，三重項状態が関与する項間交差などがある）．ここでは，第2電子励起状態（$S_2$）への励起を例にしている．実際には，最低電子励起状態（$S_1$）においても，IVR，振動緩和，電子基底状態（$S_0$）への内部転換が起こる．

1）神戸大学自然科学系先端融合研究環分子フォトサイエンス研究センター

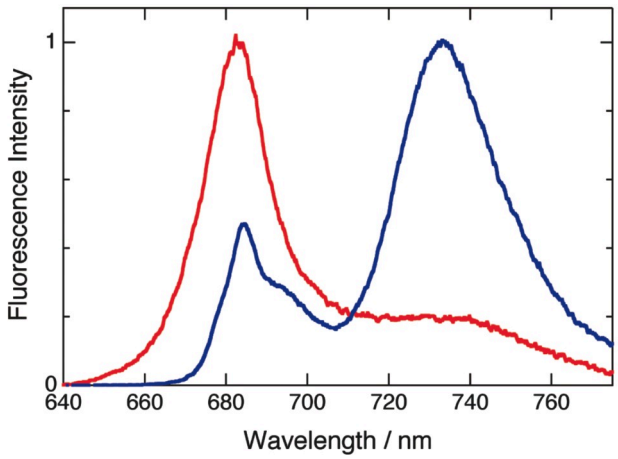



**図 2**：シロイヌナズナチラコイド膜の蛍光スペクトル
赤は室温，青は 77 K でのスペクトルを示す．77 K では室温と比較してスペクトルが鋭くなっており，光化学系 II クロロフィル *a* からの蛍光バンドが 684 nm と 695 nm 近辺に，光化学系 I クロロフィル *a* からの蛍光バンドが 733 nm に観測されている．

少しずつ異なり，明確なピークを示さない生物や，もっと長波長の 760 nm 付近にバンドが確認されるシアノバクテリア（スピルリナ）[4] なども報告されている．LHC I を持たないシアノバクテリアでは光化学系 I 複合体は 3 量体を形成するが，3 量体形成に伴い，長波長蛍光を発するクロロフィル数が変化したり，単量体にはみられない波長領域にバンドが観測されたりする[4]．光化学系 I 複合体，光化学系 II コアアンテナ，および，アンテナ色素タンパク質複合体に存在する集光性クロロフィル *a* や *b* は，長波長領域に蛍光を出すクロロフィル *a* に励起エネルギーを効率よく移動させるので，大量に存在するにもかかわらず 77 K での定常光測定では弱い蛍光しか観測されない．光化学系 I，II 蛍光バンドの強度比をはかることで，光化学系 I，II の量比や，相互間でのエネルギー移動が推定できる．蛍光強度や収率の変化を測定することで光化学系間のエネルギー移動の変化（ステート遷移）や，光化学反応も研究されている（4.3 a，b 項参照）．

## 2.a.2　蛍光励起スペクトル

蛍光を観測する波長を固定し，蛍光強度を励起波長の関数として表したものを蛍光励起スペクトルと呼ぶ．一種類の色素分子を含む希薄溶液では，蛍光励起スペクトルは吸収スペクトルと同じものとなる．一方，複数種の色素分子が存在する時は，蛍光励起スペクトルは吸収スペクトルとは一致しないが，特定の色素分子の吸収スペクトルを反映したものとなる．また，光合成色素タンパク質複合体など複数の色素分子が近接して存在する場合には，色素分子間の励起エネルギー移動効率に依存したスペクトルが得られる．エネルギーアクセプターの蛍光を観測しながら蛍光励起スペクトルを測定すると，エネルギー移動効率が高い場合にはエネルギードナーとエネルギーアクセプターの吸収スペクトルを足し合わせたスペクトルが得られ，エネルギー移動効率が低い場合にはエネルギードナーの寄与の小さいスペクトルが得られる．

実際の測定では，励起光源や分光器の特性を反映して励起光強度が波長に依存し変動するため，あらかじめ励起光の分光特性を調べ装置の較正を行う必要がある[5]．特に，励起光源の経年変化に注意を要する．

## 2.a.3　時間分解蛍光分光法

サンプルを十分に短いパルス幅を持った光源で励起し，その後の蛍光強度の変化，蛍光スペクトルの形状の変化，蛍光異方性の変化などを時間の関数として観測する方法である．従来は，サブピコ秒から数 10 ピコ秒（$10^{-13}$〜$10^{-11}$s）のパルス幅を持った色素レーザーが光源として用いられていたが，最近では，フェムト秒領域（≤ $10^{-13}$s）のパルス幅を持ったチタンサファイアレーザーが用いられることが多い．

数ピコ秒から数 100 ナノ秒領域（$10^{-12}$〜$10^{-7}$s）で起こる現象の観測には，時間相関単一光子計数法[6,7] やストリークカメラ法[8] が用いられる．前者は，感度が高くダイナミックレンジが広いため遅延蛍光などの微弱蛍光成分の検出に適しているが，基本的に観測は単一波長について行われる．それに対して後者は，時間—波長の 2 次元測光が可能であるため光照射により劣化がみられる試料の測定に適しているが，ダイナミックレンジが狭い．したがって，観測する現象や試料に応じて測定法を選ぶか，併用することが望ましい．ピコ秒より短い時間領域の測定には，蛍光アップコンバージョン法[9,10] や光カーゲート法[11,12] などが用いられる．

時間分解測定では，高電子励起状態，振動励起状態からの蛍光が得られ，内部転換や振動緩和などを詳細に検討することができる．また，光合成色素タンパク質複合体ではエネルギードナーとなる色素分子からの蛍光を捉えることができ，構成色素分子が発する蛍光スペクトルの時間変化を観測することにより，色素分子間での励起エネルギー移動を実時間で追跡することができる[13]．異なる波長領域に蛍光を発する色素分子間での励起エネル

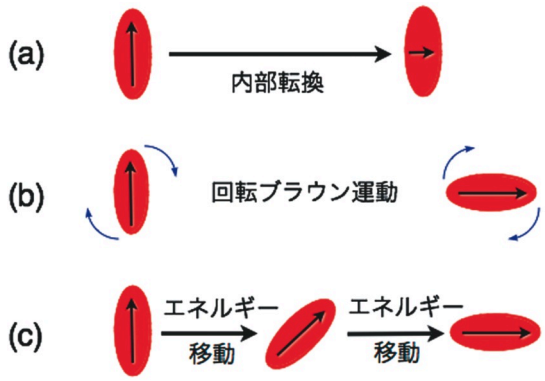



図3：偏光が解消される過程
(a) 内部転換，(b) 回転ブラウン運動，(c) 励起エネルギー移動．赤い楕円は色素分子を，その中にある黒矢印は遷移双極子モーメントの向きを示す．

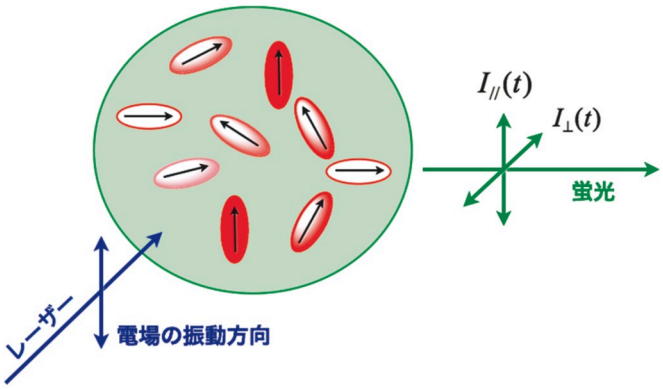



図4：直線偏光を用いた蛍光偏光の測定
励起光（図ではレーザー光）の電場の振動方向と遷移双極子モーメントの方向が平行に近い分子が選択的に励起される（赤色の濃い分子）．励起光源の偏光方向と平行な蛍光偏光成分 $I_{//}$ および垂直な蛍光偏光成分 $I_{\perp}$ の観測を行う．

ギー移動の観測に適している．

## 2.a.4 蛍光異方性

レーザー光など電場の振動方向が一定方向に揃った光源（直線偏光）を用いて物質を励起すると，電場の振動方向と遷移双極子モーメントの方向が平行に近い分子が選択的に励起される（平行の時で最大，直交する時は0）．したがって，タンパク質中で光合成色素がランダムな向きに分散している場合でも，直線偏光を用いて励起を行うと，励起直後は色素分子から発せられる蛍光もまた偏光性を示す．蛍光の偏光性は，(a) 内部転換，(b) 色素分子の向きの変化，(c) 励起エネルギー移動，などにより失われる（偏光解消，図3）．(a) は，励起された電子状態と蛍光を発する電子状態の遷移双極子モーメントの向きが異なる場合である．(b) は，励起状態にある間に色素分子の向きが変わることによって，励起時点での遷移双極子モーメントの向きと発光時点での遷移双極子モーメントの向きが異なる場合である．溶液中における回転ブラウン運動がその例である．(c) は分子間過程であり，遷移双極子モーメントの向きが異なる色素分子へと励起エネルギー移動が起こり，励起された色素分子と発光する色素分子が異なる場合である．

励起光源の偏光方向と平行な蛍光偏光成分を $I_{//}$，垂直な蛍光偏光成分を $I_{\perp}$ とする（図4）と，蛍光異方性 $r$ は，

$$r=\frac{I_{//}-I_{\perp}}{I_{//}+2\,I_{\perp}} \qquad (1)$$

と定義される．この時，等方的な蛍光強度は $I_{//}+2I_{\perp}$ で与えられる．励起子相互作用などがある場合を除き，等方的なサンプルから観測される $r$ の値は，$0.4 \geq r \geq -0.2$ となる．時間分解蛍光分光法により，$I_{//}$ および $I_{\perp}$ の時間変化（それぞれ，$I_{//}(t)$，$I_{\perp}(t)$）の測定を行えば，$r$ の時間変化 $r(t)$ が

$$r(t)=\frac{I_{//}(t)-I_{\perp}(t)}{I_{//}(t)+2\,I_{\perp}(t)} \qquad (2)$$

と求められる．等方的な蛍光強度の時間変化，すなわち，蛍光減衰曲線は $I_{//}(t)+2\,I_{\perp}(t)$ として得られる．偏光解消過程を反映して時間と共に $r(t)$ が変化し，例えば，同じ波長領域に蛍光を発する色素分子間での励起エネルギー移動を実時間で観測することができる[7,14]．

実際の測定では，検出系（回折格子，光電子増倍管，など）の感度が偏光の方向に対して一様でない場合があり，その補正を考慮する必要がある．鉛直方向および水平方向に偏光した光に対する検出系の感度の比（$G$ 因子）を観測波長の関数として求める方法や，簡単には，偏光解消板を蛍光観測用の分光器の前に設置する方法がある[5,7]．

## 参考文献

1）T. Gillbro & R. J. Cogdell, Chem. Phys. Lett., **158** (1989) P.9.
2）M. Gouterman, The Porphyrins, ed. D. Dolphin Ed., Vol. III, New York, Academic Press, 1978, p.1.
3）M. Nakayama, T. Yamaoka, & S. Katoh, Plant Cell Physiol., **20** (1979) P.1565.
4）N. V. Karapetyan, D. Dorra, G. Schweitzer, I. N. Bezsmertnaya & A. R. Holzwarth, Biochem., **36** (1997) P. 13830.
5）木下一彦，御橋廣眞編，「螢光測定」，学会出版センター，1983.
6）山崎巖，藤田昌久，内田勝雄，進藤善雄，馬場宏明，応

用電気研究所報告，**26**（1974）P.124.
7）D. V. O'Connor & D. Phillips, Time-correlated single photon counting. London, Academic Press, 1984.
8）P. P. Ho, A. Katz, R. R. Alfano, & N. H. Schiller, Opt. Commun., **54** (1985) P.57.
9）J. Shah, IEEE J. Quantum Electric., **24** (1988) P.276.
10）秋本誠志，木場隆之，横野牧生，三室守，山崎巖，分光研究，**54**（2005）P.18.
11）M. A. Duguay & J. W. Hansen, Appl. Phys. Lett. **15** (1696) P.192.
12）永原哲彦，兼松泰男，木下修一，岡田正，分光研究，**49**（2000）P.186.
13）I. Yamazaki, M. Mimuro, T. Murao, T. Yamazaki, K. Yoshihara, & Y. Fujita, Photochem. Photobiolo., **39** (1984) P.233.
14）S. Akimoto & M. Mimuro, Photochem. Photobiolo., **83** (2007) P.163.

# 2．分光測定法
## b．熱発光・遅延発光

小野　高明[1)]

電荷分離反応の結果生じた光化学系II反応中心の還元側と酸化側の電子伝達成分上の正電荷と負電荷の再結合により発光が起こる．この発光（遅延発光・熱発光）は光化学系IIの電子伝達成分（特に酸素発生系）に関する有用な情報を数多く含む．

## Thermoluminescence and delayed light emission

Takaaki Ono

Thermoluminescence and delayed light emission arise from an excited state of photosystem II reaction center (P680), which is formed by charge recombinations between positive and negative charges stabilized in photosystem II.　They provide useful information on the function of PSII, especially on photosynthetic oxygen evolving system.　In this chapter, we describe application of these techniques for probing PSII.

### 2.b.1　はじめに

熱発光（TL: thermoluminescence）と遅延発光（DLE: delayed light emission，遅延蛍光／DLF: delayed fluorescence とも呼ばれる）は，主として，光吸収に伴う光合成光化学系II（系II）反応中心における電荷分離反応の結果，系IIの酸化側に生じた正電荷（正孔）と還元側に生じた負電荷（電子）に由来するこれらの再結合により系II反応中心クロロフィル P 680 の再励起され発光が起こる．電荷再結合過程では最終的に生成する $P680^+Phe^-$ 上の正負電荷の再結合に伴い，ある確率で P 680 の一重項励起状態（P 680*）が生成する．従って，これらの発光は光照射により系IIが励起された場合の蛍光と基本的に同じスペクトルを示す．熱発光と遅延発光はともに，系IIの酸化側，還元側で生じた分離電荷の性質に関する情報を与えるため，光化学系II自身を対象とした研究や，系IIを通じた光合成反応の全体的な評価に用いられている．

熱発光と遅延発光は同じ現象を異なった手法により観測するものであり，得られる情報も原理的には同等である．また，測定に使用する装置も基本部分は共通な場合が多く，本章では熱発光・遅延発光について，測定方法を中心に紹介する．

熱発光と遅延発光には，その由来が系II光化学反応とは直接関係ないものや，一重項励起状態（P 680*）が関与しないものもあるが，それらについては一部を除き触れない．また，系Iではその強度は弱く，特殊な場合以外ほとんど観測されない．熱発光と遅延発光（特に熱発光）は酸素発生系を中心とした系II自身の研究や，研究環境ストレス等が光化学系に与える影響の評価に広く使われている．応用例についてはレビュー等[1–9]を参照されたい．

1）茨城大学工学部生体分子機能工学科

### 2.b.2　遅延発光と熱発光に関与する光化学系II反応

遅延発光と熱発光の理解に必要な，系IIにおける電荷分離反応と引き続いて起こる分離電荷の安定化に関与する電子伝達成分について，その概要を述べる．

図1に示されるように，系II反応中心における電荷分離の結果生じた $P680^+$ は $Y_Z$（D1タンパク質 Tyr161）により還元される．酸化された $Y_Z$（$Y_Z^+$）は Mn クラスターからの電子供与により再還元される．Mn クラスターは4つの Mn と1つの Ca からなる複核錯体であり，水の酸化反応で中心的な役割をはたしている．Mn クラスターを中心とする水酸化触媒は，$Y_Z^+$ への電子供与により1電子当量ずつ酸化され，最も還元された $S_0$ から最も酸化された $S_4$ までの状態をとる．$S_4$ は不安定で暗所で2分子の水を酸化して $S_0$ にもどり，1分子の酸素が生成される．暗所に置いた系IIでは，クラスターの大部分は安定状態である $S_1$ にあるため3閃光の照射後に酸素が発生する．$S_2$ と $S_3$ は正電荷を持つ．D2タンパク質の Tyr160（$Y_D$）も $P680^+$ により酸化されるが，酸素発生反応には関与していない．酸化された $Y_D$ は暗所

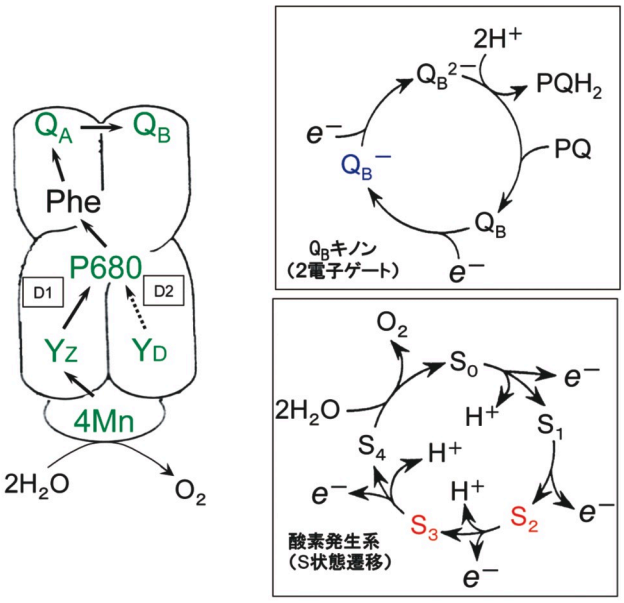



**図1**：光化学系IIにおける酸化還元成分の配置と電子移動の模式図(左)；酸素発生系におけるS状態遷移と$Q_B$キノン部位における2電子ゲート(右)
熱発光と遅延発光に関与する電子伝達成分を緑で，熱発光と遅延発光に関与するS状態を赤で，$Q_B$キノンを青で示す．

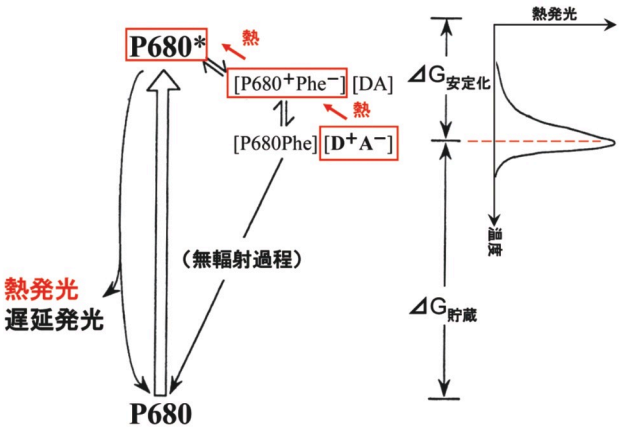



**図2**：光化学系IIにおける電荷再結合による発光スキーム
励起状態のP 680 (P 680*) のエネルギーは電子移動反応により自由エネルギー（$\Delta G_{安定化}$）を失い$D^+A^-$電荷分離状態として安定化される．電荷分離過程は可逆過程であり，電荷再結合過程の活性化エネルギー（$\Delta G_{活性化} \fallingdotseq \Delta G_{安定化}$）に相当するエネルギーを得るとP 680が再励起され発光が起こる．一定の温度条件化では，確率的にP 680が再励起され発光（遅延発光）がおこる．一方，加熱状態では，活性化エネルギーに対応する温度で電荷再結合が高い確率で起こり発光（熱発光）する．

で比較的安定に存在する．このほか，シトクロム$b_{559}$，カロチノイド，クロロフィルもP 680$^+$により酸化されるが，これらの酸化型は電荷再結合によるP 680*形成には寄与しない．

一方，還元されたフェオフィチン（$Phe^-$）はD 2タンパク質に結合する$Q_A$キノン受容体により再酸化される．還元された$Q_A$キノン受容体($Q_A^-$)はD 1タンパク質に結合する$Q_B$キノン受容体を還元する．生成したセミキノン$Q_B^-$は比較的安定で，次の閃光での電荷分離反応により生成した$Phe^-$から2個目の電子を受け取る．2電子還元体$Q_B^{2-}$はチラコイド膜内プールの酸化型プラストキノンにより置き換えられるため，$Q_B$キノン受容体は閃光照射ごとに交互に$Q_B$と$Q_B^-$となる．

## 2.b.3　遅延発光と熱発光

### 2.b.3.1　遅延発光[8,10−16)]

葉緑体などの試料を光照射すると，遅延発光または遅延発光と及ばれる微弱な発光が，光照射直後から分の時間域でおこる．発光強度は光照射直後が強く，時間とともに指数関数的に減衰する（強度変化の様子は減衰曲線と呼ばれる)．この発光は，光照射の結果生じた系IIの酸化側と還元側の様々な電子伝達成分上に分布した正負電荷が再結合する時にP 680を再励起することに由来する．光照射後どの時間領域で発光するかは，電荷再結合を起こす正負電荷の安定性（再結合に必要な自由エネルギーの変化の大きさ）に依存し，それらがどの電子伝達成分上にあるかで決まる．すなわち，光照射直後の発光は光化学系IIの反応中心に近い酸化還元成分間での電荷再結合に由来し，時間経過とともに反応中心からより離れた酸化還元成分上の電荷同士の再結合に由来する発光が主成分となる．光化学系Iで生成した分離電荷の再結合に由来する遅延発光も報告されている[17,18]．

### 2.b.3.2　熱発光[1−9)]

光照射後に試料を急速冷却すると，液体窒素温度（77 K)などのように温度が十分に低ければ，冷却過程で電荷再結合を起こさなかった正負電荷は，低温下で安定にトラップされる．この後，試料温度を徐々に上げ，電荷再結合の活性化エネルギーに相当する熱エネルギーを供給すると，トラップされた正負電荷間で再結合がおこり，ある確率でP 680が再励起され発光が観測される．(図2)

## 2.b.4　熱発光測定と遅延発光測定

光照射に続いて観測される遅延発光の場合は，一定温度環境から供給される熱エネルギーに依存して電荷再結合が起こる．そのため，光照射後の発光強度の時間経過は，各正負電荷対の再結合の確率の違いを反映して，異なった時定数を持つ指数関数的減衰成分の足し合わせとして表される．一般に，各々の減衰成分を正確に分離す

るにはかなり煩雑な操作が要求される．実際の実験では，遅延発光に含まれる成分の数，強度，時定数が不明の場合も多い．各成分の正確な分離ができないと，観測された遅延発光の起源となる正負電荷対の正確な同定や定量が困難となる．

一方，熱発光では，活性化エネルギーが外部加熱で与えられる為，特定成分間での電荷再結合が特定温度領域で起こる．試料温度に対して熱発光強度をプロットした曲線（熱発光グローカーブ又は熱発光バンド）は山型（ピークを与える）となり，遅延発光の各減衰成分は異なったピーク温度をもつバンドとして分離される．正負電荷の酸化還元電位と関連する再結合の自由エネルギー変化の大きさの違いが熱発光バンドのピーク温度の違いとして現れる．このピーク温度から，関与する正負電荷対の酸化還元電位を推定できる．また，バンドの強度から各正負電荷対の相対量をある程度見積もる事ができる．さらに，各正負電荷対の酸化還元電位の変化がピーク温度の変化として現われるため，僅かな変化も容易に検出出来る．遅延発光では，酸化還元電位の変化は主に発光強度の減衰キネティックスの変化として現われる為，解析は容易ではない．

以上のような理由から，近年では系IIで起こる光化学反応過程に関する研究手法としては熱発光がもっぱら用いられ，遅延発光が用いられる事は少ない．従って，本稿でも熱発光を中心に話を進める．しかしながら，熱発光測定だけからでは，発光に伴う自由エネルギー変化などの熱力学的パラメーターを正確に求める事は困難である．遅延発光の測定により熱発光測定で求めたパラメーターの評価が行える．また，遅延発光測定では，試料の冷却や加熱装置が不要で，より簡便な装置で測定可能である．また，装置によって異なるが，熱発光測定では試料交換も含み，1試料あたり20－30分程度の測定時間が必要だが，遅延発光測定では数分で測定を終えることが出来，原理的には，多検体測定や連続測定，イメージングも可能である．また，ミリ秒領域に現われる遅延発光の強度はチラコイド膜を介した膜電位形成と関連する事が知られている[19]．さらに，藻類細胞などでは，光照射後数秒から1分程度の発光は，電子伝達系全体の状態を反映すると思われる特徴的な時間変化を示す．これらの特色を生かし，藻類の遅延発光を環境中の藻類の量や種類の評価に用いたり[20]，環境モニタリングプローブとして用いたりする研究も行われている[21,22]．

## 2.b.5　測定装置と測定の実際

### 2.b.5.1　装置の構成

熱発光測定はほとんどの場合，それぞれの研究者が自作した装置でおこなわれており，その装置構成も研究者ごとにかなり異なる．また，装置の詳細は論文等には記述されていない．しかしながら，基本的には以下の四つの部分から構成されている．微弱光の測定部と試料の光照射部の利用で遅延発光測定に対応できる．

- ●試料ホルダー部
- ●試料温度の制御部
- ●微弱光の測定部
- ●試料の光照射部

これらの構成の主要な部分について以下に述べる．

### 2.b.5.2　試料ホルダー

熱発光測定では試料を光照射後，急速に冷却し，その後，一定の速度で試料温度を上げる．様々な試料ホルダーが用いられるが，可動タイプと固定タイプの2つに分けられる．

図3は筆者が用いている可動タイプの試料ホルダーの概略である．非常にシンプルな作りだが十分に実用に耐える．試料は適当な大きさのアルミ板とアクリル板の間に挟み込み固定する．アルミ板には試料加熱用のヒーターが装着されている．ヒーター装着に際しては，試料全面が均一に加熱されるよう注意を払う．この例では，

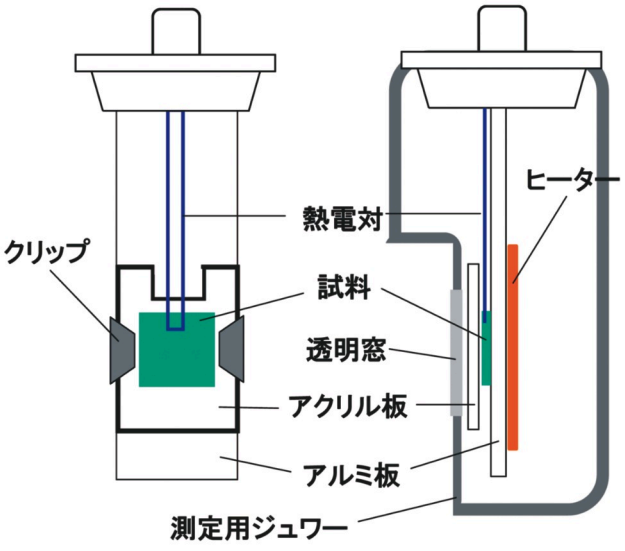



**図3**：可動タイプの試料ホルダーの例
正面（左）と側面（右）．右図は測定用ジュワーに装着した状態．測定用ジュワーの透明窓が平面状になっており，光ファイバーを試料に接近して設置できるようになっている．

シリコンラバーヒーターを厚さ 1 mm のアルミ板の裏面に直接接着してある．素早い温度変化が可能なように，アルミ板の厚さと装着するヒーターの W 数を最適化する必要がある．

液体の試料は 1 cm 四方のロ紙に浸み込ませ，アルミ板とアクリル板の間に挟み，クリップでしっかり固定する．葉などはコルクボーラーなどで打ち抜き，直接試料ホルダーに挟み込む．温度測定用の熱電対（Cu／コンスタン）を試料上に直接置き試料と共にホルダーに挟み込む．この状態でホルダーを透明窓を持つジュワー瓶に移す．ジュワーを液体窒素で予冷し，ヒーターの印加電圧を調節する事で，試料温度を制御する．光照射後，ホルダーを液体窒素中に投入し，急速冷却する．5 秒以内に 100 K に達する．冷却した試料ホルダーを測定用ジュワーに移し，ヒーター電源を投入して測定を開始する．試料温度はヒーターからの熱の供給量と試料ホルダー自身の熱容量に応じて上昇するので，ヒーターへの印加電圧を変化させることで昇温速度を調整できる．この方法では，試料温度が全温度範囲で直線的に昇温するわけではないが，−50℃から＋50℃までほぼ一定速度で昇温でき，熱力学的パラメーターを求めるなど正確な昇温速度の制御が必要な場合を除き，実用上問題ない．昇温速度を正確に制御したい場合は，測定用ジュワー内に冷却した窒素ガス（液体窒素中に投入した蛇管に窒素ガスを通すことにより容易に得られる）を一定流量で流して冷却しつつ，適当な温度制御装置によりヒーター出力をフィードバック制御する．

図 4 は固定タイプの試料ホルダーの例である．この場合，試料用の凹（直径 15 mm，深さ 0.5 mm）を持つアルミ板を温度制御可能な熱交換ステージ（顕微鏡用熱交換ステージなどが利用できる）に固定してある．試料をホルダーに乗せ，上からアクリル板で蓋をする．試料温度は熱交換ブロックに埋め込まれたヒーターと冷却窒素ガスで制御する．試料に接して置かれたた熱電対で温度を検出する．適当な光源からの光をライトガイドで試料ホルダーまで導入し，試料を光照射する．照射後，冷却窒素ガスの流量を最大まで上げ試料を急冷する．25 秒以内に 100 K に達する．可動タイプと比べると冷却速度は比較的遅いが，熱発光測定の主な適応例である酸素発生系の場合，$S_2Q_A^-$ 電荷分離状態の寿命が 5 ℃で約 30 秒なので，電荷分離状態のトラップには十分な冷却能力である．冷却後，適当な温度制御装置によりヒーター出力をフィードバック制御することにより昇温速度を制御する．この装置では，6 〜108℃/min の範囲で昇温速度を正確に制御できる．上に述べた例では，加熱にヒーターを用いているが，この代わりにペルチェ素子も利用できる．

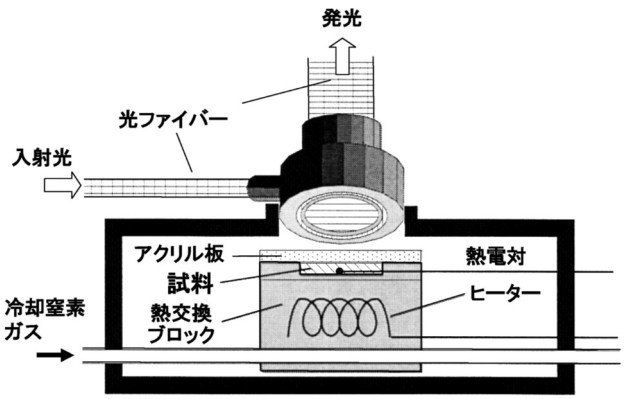



**図 4**：固定タイプの試料ホルダーの例
熱交換ブロックに埋め込まれたヒーターと冷却窒素ガスで試料温度を制御する．リング型ライトガイドで励起光を試料面まで誘導し，リング型ライトガイドの中空部分を通り，試料に近接して設置された光ファイバーで試料からの発光を集める．

### 2.b.5.3　発光の検出

熱発光・遅延発光の強度はかなり低いため，その検出には光電子倍増管（PMT: photo multiplier tube）が用いられる．クロロフィル蛍光に対応する長波長領域で十分な感度を持つものを選択する．マルチアルカリの光電面を持つ PMT はバイアルカリ光電面を持つ PMT より長波長感度が高いが，バイアルカリの方が暗電流は低い．エンドオンタイプの受光面を持つ PMT 使用が望ましい．PMT を冷却することにより暗電流を減らし，信号／ノイズを高めることができる．またシングルフォトンカウンティング計測により微弱光を感度よく測定できる．PMT 冷却機能付のフォトンカウンティング装置が市販されている．

微弱光測定では試料からの発光を効率よく PMT の光電面に集めることが重要である．立体角を稼ぐためには試料と PMT の距離を可能な限り短くする．PMT を試料に接近して配置する事が困難なら，試料からの発光をレンズで PMT の光電面に集光したり，試料近傍に光ファイバーを置いて発光を PMT に誘導したりする．微弱光測定用に PMT，電源等を一体化したコンパクトなシングルフォトンカウンティング装置（浜松ホトニクス）も市販されている．遅延発光測定では ICCD（intensified CCD）も用いられている[23]．

### 2.b.5.4　試料の照射

電荷分離状態を実現する為には試料を励起光照射する必要がある．実験目的により最適な光照射方法（光源，照射方法，照射条件）を選択する．固定タイプの試料ホ

**表1**：熱発光バンド・遅延発光成分と発光に関与する分離電荷対

| 発光 | | | 電荷分離対・起源 |
|---|---|---|---|
| 熱発光バンド | | 遅延発光成分 | |
| バンド名 | ピーク温度(°C) | | |
| Low temperature bands | −250, −220, −200 | | Chl の凝集体 |
| Z-band | ～−160 | | $Chl^{+}Chl^{-}$ |
| Zv-band | −80 to −30* | ～150 μs | $P\,680^{+}(Chl^{+}?)Q_A^{-}$ |
| A-band | ～−15 | ～4 ms | $S_3Q_A^{-}$ |
| $A_T$-band | ～−15 | ～4 ms ? | $His(Yz\cdot)Q_A^{-}$ |
| Q-band | ～+ 5 | ～2 s | $S_2Q_A^{-}$ |
| $B_1$-band | ～+20 | ～30 s | $S_3Q_B^{-}$ |
| $B_2$-band | ～+30 | ～60 s | $S_2Q_B^{-}$ |
| AG-band | ～+40 | | $S_2Q_BX^{-}$ |
| C-band | ～+50 | ～10 min | $Y_D\cdot Q_A^{-}$ |
| High temperature bands | +50 to +70 | | 酸化的化学発光 |
| High temperature bands | ～+130 | | 脂質の過酸化 |

*ピーク温度は光照射温度に依存して変化する．
四角内は，光化学系IIに由来する発光．緑文字は酸素発生系に関係する発光．

ルダーでは光ファイバーで効率的に試料を照射できる．以下に，いくつかの例と留意点を述べる．

酸素発生反応の研究では，酸素発生系のS状態（$S_2$ と $S_3$ 状態）と系II還元側の $Q_B^-$（場合によっては $Q_A^-$）間で起こる電荷再結合に由来する発光を観測する（図1参照）．通常は試料の閃光照射でこれらを生成する．この光源としてキセノン（Xe）フラッシュが用いられる．試料中の全ての系IIが1回だけ全部励起されるように，短い閃光寿命（～3 μ 秒以下）と強い閃光強度が必要である[注1]．試料の照射温度は，装置の冷却能力・電荷再結合の寿命・電荷分離対生成の温度依存性を考慮して決める．熱発光測定の場合，閃光照射後の試料冷却に秒オーダーの時間が必要なので，特別な場合を除き，酸素発生系と $Q_B$（$Q_A$）上で安定化された正負電荷のみが発光に寄与する．遅延発光では，これらの電荷分離状態からの発光は(測定温度にも依存するが)閃光照射後，数百ミリ秒以降に現われる発光の大部分を占める．酸素発生活性を保持した試料を暗順応後1閃光照射すると $S_2Q_B^-$ が，$Q_A^-$ から $Q_B$ への電子移動を止める系II特異的阻害剤(DCMU)を加えて1閃光照射すると $S_2Q_A^-$ が安定電荷対として生成するので(図8参照)，これらに由来する熱発光や遅延発光を測定する事で，自作の熱発光・遅延発光装置の能力や精度の評価が可能である．

低温にピークを持つ熱発光バンド（表1参照）の測定では，通常，発光温度付近で光照射した後，試料を急冷する．通常，電荷分離状態形成の量子収率が低いため励起光として連続光を用いる場合が多い．また，試料を室温からゆっくりと冷却しながら連続光照射すると，様々な電荷分離状態が実現し，昇温に伴いそれらに由来する熱発光バンドが重なって観測される．

遅延発光測定では，試料を秒オーダーの連続光で照射し，その後の発光減衰曲線の様子を調べることもある．

## 2.b.6 装置のセットアップ

図5は固定タイプの試料ホルダーを持つ熱発光測定装置のブロックダイアグラムを示す．リング型ライトガイド（外側）で励起光を試料近くまで誘導し，その中空部分を通して試料近くまでいく別の光ファイバーで試料からの発光を集める（図4）．光ファイバーの反対の出口側のレンズで発光をPMT受光面に集める．Xe閃光光源とPMTの前に電動シャッターが置かれている．閃光照射時にはXe閃光側のシャッターを開け，PMT側のシャッターを閉じる．閃光照射後，Xe閃光側のシャッターを閉じ，PMT側のシャッターを開けることで，熱発光測定と同じ光学系で遅延発光の測定ができる．

可動タイプの試料ホルダーを使用する熱発光測定でも基本的には同じブロックダイアグラムでよい．ただし，試料照射は測定とは別に行われるので，緑色で囲まれた部分のみ使う．試料からの発光を効率よく検出するため，

[注1] 実際には，試料全体を完全に励起できない(飽和していない)強度の照射閃光でも，強い照射を受ける試料表面からの発光がより強く検出されるので，S状態遷移に伴う熱発光強度の閃光照射依存4周期振動を検出できる場合が多い．また，～10 μ 秒程度の閃光寿命であれば，詳細な解析が必要な場合を除いて使用できる．

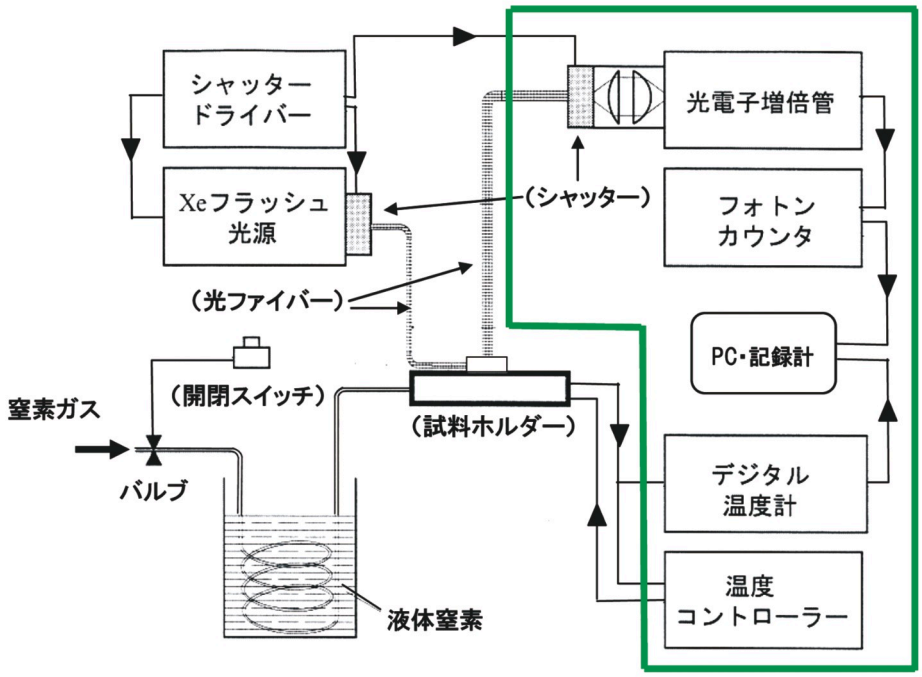



**図5**：熱発光測定のブロックダイアグラム
固定タイプの試料ホルダーを使用する場合を示してある．可動タイプの試料ホルダーを使用する場合，試料の照射は測定系とは切り離されて行われるので，緑色で囲まれた部分のみが必要となる．

可動タイプの試料ホルダー測定用ジュワーの透明窓部分の一部を平面状（図3）とし，試料ホルダー（ジュワー内）と光ファイバー（ジュワー外）を近接して設置できるよう工夫してある．

遅延発光測定のみを目的とする場合は，通常，試料温度の厳密な制御は必要ないので，試料周りの自由度は高く，目的に応じたセットアップが可能である．液体試料の場合は通常の光学キュベットを用いてもよい．励起光源のアフターグローが問題とならない時間領域のみで測定を行う場合は光源と試料間のシャッターは必ずしも必要ではない．シャッターを用いた場合，励起光照射直後のミリ秒以下の時間領域の遅延発光の測定は困難だが，現在，この領域の遅延発光測定が必要となる場合はあまりないと思われる．遅延発光の測定方としては，ベクレルタイプの燐光計を用いる方法があるが，現在ではほとんど使われていない．

## 2.b.7　市販の熱発光・遅延発光測定装置

熱発光・遅延発光測定は，その大部分が研究者により自作された装置を用いておこなわれているが，市販品もある．

熱発光装置はPhoton System Instruments社で市販されている（TL-200/PMT）．この装置は固定タイプの試料ホルダーを備え，PMTを試料ホルダーの直ぐ上に近接して設置してある．励起閃光光源はLEDを用い，閃光照射後，100 msからの遅延発光測定もできる．

浜松ホトニクス社では微弱発光計測システム（PMX-6100，PMX-2100）を供給しており，この装置を用いて遅延発光測定が可能である．光源と試料間，試料とPMT間にシャッターがあり，励起光照射後に前者を閉じた後，後者を開け遅延発光の測定を行う（図6）．両装置とも非常にコンパクト（PMX-2100は78 mm×163 mm×125 mm）に作られている．3つのLEDユニットを備えており，LEDの波長を選択することにより目的に応じた様々なシークエンスによる試料励起が可能である．PMX-6100では様々な形態の試料に対する試料ユニットが用意され，専用計測ソフトウエアーにより本体とPCをUSBケーブルで接続するだけで測定ができる．バッテリー（5 V）ユニットを準備すればフィールドでの測定も可能である．

## 2.b.8　熱発光バンド（遅延発光減衰曲線）と関与する系IIの酸化還元成分

試料を光照射すると，光照射条件等に依存して様々な熱発光バンドが現われる（図7）．表1は観測される熱発光バンドとそのピーク温度，起源となる分離電荷対，お

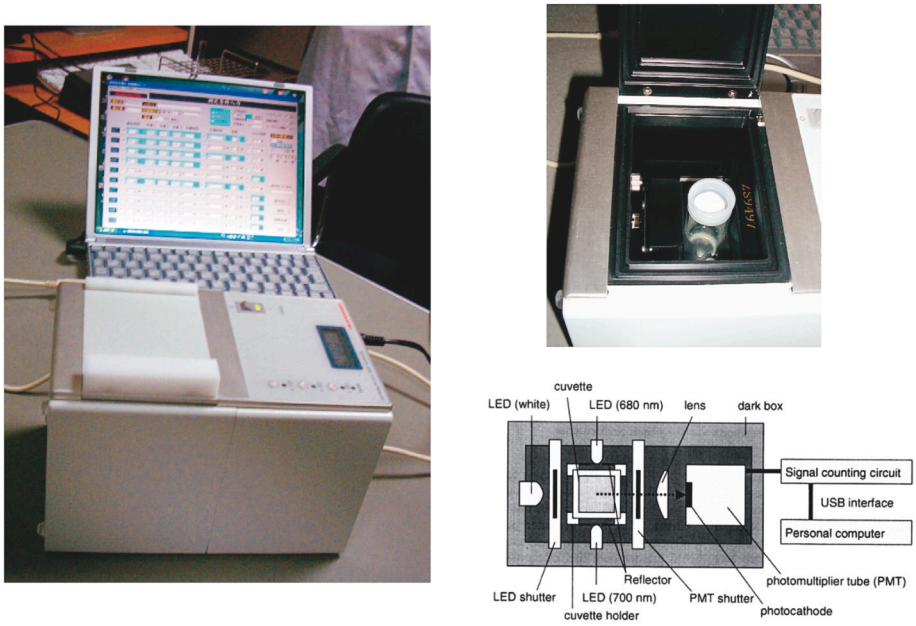



図 6：遅延発光測定装置（PMX-6100）
（左）装置の全体写真（右上）試料室：ガラス製の試料ビンによる測定（右下）測定系のセットアップ
（写真は浜松ホトニクスの好意による）

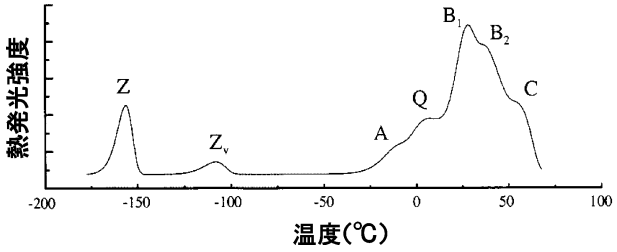



図 7：主要な熱発光バンド
各バンドの概要を示すための模式図で実測結果ではない．

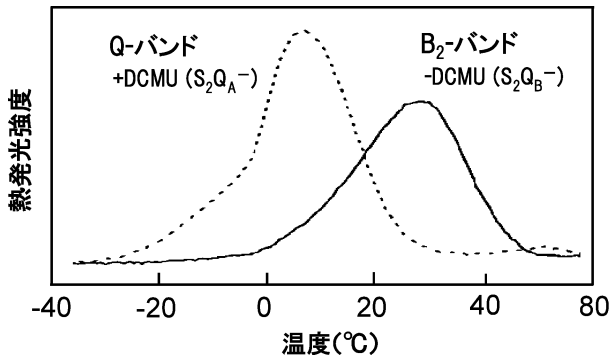



図 8：熱発光 $B_2$-バンド（$S_2Q_B^-$）と Q-バンド（$S_2Q_A^-$）

よび対応する遅延発光減衰成分の緩和時間をまとめたものである．系 II の光化学反応と密接に関連した重要な熱発光バンドは－50～＋50℃の間に現われる．

### 2.b.8.1　熱発光バンド[1-9)]

#### 2.b.8.1.1　B-バンド[24,25)]

～＋20℃にピークを示す $S_3Q_B^-$ 再結合由来の $B_1$-バンドと～＋30℃にピークを示す $S_2Q_B^-$ 再結合由来の $B_2$-バンドがある．十分に暗順応した試料を 1 閃光照射すると $B_2$-バンドのみが現れる（図 8）．$S_3Q_B^-$ 再結合による相対発光強度は $S_2Q_B^-$ 再結合によるものより強い（1.7～2.0 倍）．$B_1$-バンドと $B_2$-バンドのピーク温度は pH に依存して変化し，～pH 7.5 以上では同じピーク温度を示す．B-バンドのピーク温度は $S_2$ や $S_3$ の酸化還元電位の僅かな変化を反映して変化するので，酸素発生機能に影響を与える様々な処理が Mn クラスターに与える変化を鋭敏に検出できる．B-バンド（$B_1$＋$B_2$）の強度は照射閃光回数に対して 4 周期振動を示す（図 8）．十分に暗順応した酸素発生系は $S_0$：$S_1$＝25：75 となる状態にあり，還元側は $Q_B^-$：$Q_B$＝25：75 の状態にあるので，閃光照射回数に応じて $S_3Q_B^-$ と $S_2Q_B^-$ 状態にある系 II の数は表 2 のように 4 周期で変化する．ミスヒット（閃光によっても電荷分離が起こらない場合）やダブルヒット（閃光によって電荷分離が 2 回起こる場合）の確率や，$S_3Q_B^-$ と $S_2Q_B^-$ の発光強度比を考慮すると観測される 4 周期振動を再現できる．酸素発生活性に必須の Ca イオンや Cl イオンなどを除去し，酸素発生活性を失った試料の B-バンド強度の振動を解析して，これらがどの S 状態遷移段階に必要かを調べる事ができる．

#### 2.b.8.1.2　Q-バンド[25,26)]と A-バンド[26,27)]

～＋10℃にピークを示す Q-バンドは $S_2Q_A^-$ 再結合に

**表 2**：閃光照射による熱発光 B-バンドに寄与する分離電荷数の変化と熱発光強度の変化

| 閃光回数 | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 系IIの数 | $1S_0Q_B$ | $1S_1Q_B^-$ | $1S_2Q_B$ | $1S_3Q_B^-$ | $1S_0Q_B$ | $1S_0Q_B^-$ | $1S_1Q_B^-$ |
| $1S_0Q_B^-$ | $1S_1Q_B$ | $1S_2Q_B^-$ | $1S_3Q_B$ | $1S_0Q_B^-$ | $1S_0Q_B^-$ | $1S_1Q_B$ | |
| $5S_1Q_B$ | $5S_2Q_B^-$ | $5S_3Q_B$ | $5S_0Q_B^-$ | $5S_1Q_B$ | $5S_1Q_B$ | $5S_2Q_B^-$ | |
| $1S_1Q_B^-$ | $1S_2Q_B$ | $1S_3Q_B^-$ | $1S_1Q_B$ | $1S_1Q_B^-$ | $1S_1Q_B^-$ | $1S_2Q_B$ | |
| 熱発光 | | | | | | | |
| 系IIの数[1)] | 0 | 5 | 2 | 1 | 0 | 5 | 2 |
| 強度[2)] | 0 | 5 | 2.7 | 1.7 | 0 | 5 | 2.7 |

十分に暗順応した光化学系II（$S_0$：$S_1$＝$Q_B^-$：$Q_B$＝25：75）を閃光照射し，ミスヒット，ダブルヒットがないと仮定する．
[1)] 熱発光に寄与する光化学系IIの数
[2)] 熱発光強度＝$1\times S_2Q_B^- + 1.7\times S_3Q_B^-$

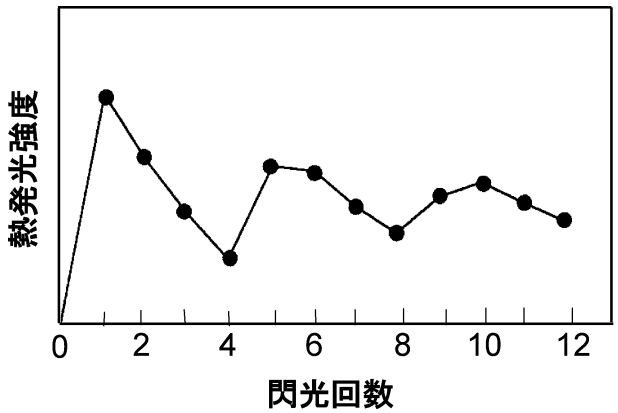



**図 9**：熱発光 B-バンド（$B_1+B_2$）強度の 4 周期振動
十分に暗順応した葉緑体を閃光照射し熱発光測定を行いB-バンド（$B_1+B_2$）強度を閃光回数に対してプロットした．

由来する．系II阻害剤である DCMU により $Q_A^-$ から $Q_B$ への電子移動を阻害した試料を光照射(閃光又は連続光)すると現われる(図 8)．$Q_B$ を失った精製された系IIコア標品では，光照射によりこのバンドがあらわれる．B-バンドと同様に，ピーク温度は $S_2$ や $S_3$ の酸化還元電位の僅かな変化を反映して変化する．また，Q-バンドのピーク温度は系II阻害剤の種類に応じそのピーク温度が様々に変化することが知られている．

～−10°Cにピークを示す A-バンドは $S_3Q_A^-$ 再結合に由来する．通常の光照射条件ではこのバンドが現れることはない．$S_1Q_B$ 状態にある試料を 2 発の閃光で照射し $S_3Q_B$ を作った後急冷し，液体窒素温度 77 K で連続光照射（～1 min）する．77 K 照射では電荷分離の結果 $Q_A^-$ が生成し，$P680^+$ はシトクロム $b_{559}$，カロチノイド，クロロフィルにより酸化される．昇温に伴い，$Q_A^-$ は $S_3$ と再結合して A−バンドが現れる．

#### 2.b.8.1.3 $A_T$-バンド[28,29)]

～−10°Cにピークを示す $A_T$-バンドは，Tris 処理やヒドロヒシルアミン処理等で Mn クラスターが失われた試料を～20°Cで光照射すると現われる．閃光照射でも現われるが，フルチャージには連続光照射が必要である．$Q_A^-$ と光酸化されたヒスチジン残基（又は $Y_Z^+$）の再結合に由来するとされている．A-バンドと同じ温度に現われるがその起源は異なることに注意が必要である．

#### 2.b.8.1.4 AG-バンド[30)]

～＋40°Cにピークを示す AG-バンドは，電子伝達の逆行反応により $S_3Q_B$ 状態にある PS II へ電子が供給されて生成する $S_2Q_B^-$ に由来すると考えられている．電子供給には光化学系 I 循環的電子伝達反応が関与している．

#### 2.b.8.1.4 C-バンド[26,31)]

～＋50°Cにピークを示す C-バンドは $Y_D^+Q_A^-$ 再結合に由来すると考えられている．C-バンドは系II阻害剤である DCMU を加えた試料を液体窒素温度で連続光照射(～2 min)すると現われる．$S_0$ と $S_1$ は正電荷を持たないため，77 K 照射で生成した $Q_A^-$ が $Y_D^+$ と電荷再結合を起こす．C-バンドは他の様々な条件においても観測される．界面活性剤ミセルに取り込まれたクロロフィルからも～＋50°Cにピークを示すバンドが現れるので注意が必要である．

#### 2.b.8.1.5 $Z_V$-バンド[31,32)]

−40°C～−100°Cで試料を連続光照射すると，照射温度より 10～20°C高い温度にピークを示す $Z_V$-バンドが現れる．反応中心標品など，Mn クラスターを持たない試料でも現われる．$P680^+Q_A^-$ 再結合に由来すると考えられている．

#### 2.b.8.1.6 その他の熱発光バンド

これまで述べた熱発光バンドは光化学反応の結果，系IIに生成する正負電荷の再結合に由来したが，系IIと直接関係ない熱発光バンドも存在する．試料を液体窒素温度で連続光照射すると～−160°Cにピークを示すブロードなバンドが現れる (Z-バンド[24,33)])．また，試料を液体ヘリウム温度で連続光照射すると～−200，−220，−

250°Cにピークを示すブロードなバンドがあらわれる[34]．これらのバンドは光照射によりクロロフィルの凝集体においてクロロフィル分子間の電子移動がおこり，その結果生成した $Chl^{+}Chl^{-}$ 間の電荷再結合反応に由来すると考えられている．また，50°C以上の高温では様々な酸化プロセスや脂質の過酸化に由来するバンドがあらわれる[35−37]．これらの過程で生成する一重項酸素などの活性種からクロロフィルへのエネルギー移動により化学発光がおこる．これらのバンドは試料を光照射しなくても現われるが，光照射によりその強度が高くなる場合が多い．

### 2.b.8.2　遅延発光減衰曲線

遅延発光の減衰曲線は様々な寿命を持つ分離電荷対間の再結合に由来する，異なった時定数で指数関数的に減衰する曲線の足し合わせと理解される．表1に見られるように，各減衰成分の緩和時間より関与する正負電荷対の種類が推定できる．暗順応した葉緑体標品を1閃光照射した後の遅延発光減衰曲線を図10に示す．主成分は，DCMUの存在下では～8秒，非存在下では～70秒で緩和し，それぞれ，$S_2Q_A^-$，$S_2Q_B^-$ の再結合に由来している．

藻類やシアノバクテリアの細胞や葉では，様々な部分で安定化された電荷が関与し，それらの再結合も細胞の生理状態を反映するため減衰曲線はより複雑となり，指数関数的に減衰する曲線の足し合わせでは記述できなくなる．図11は好熱性シアノバクテリア *Thermosynechococcus. elongatus* 細胞を，様々な条件で光照射した後の遅延発光の減衰曲線を示したものである．それぞれのピークの由来は不明な部分も多いが，細胞の生理状態の指標となる．

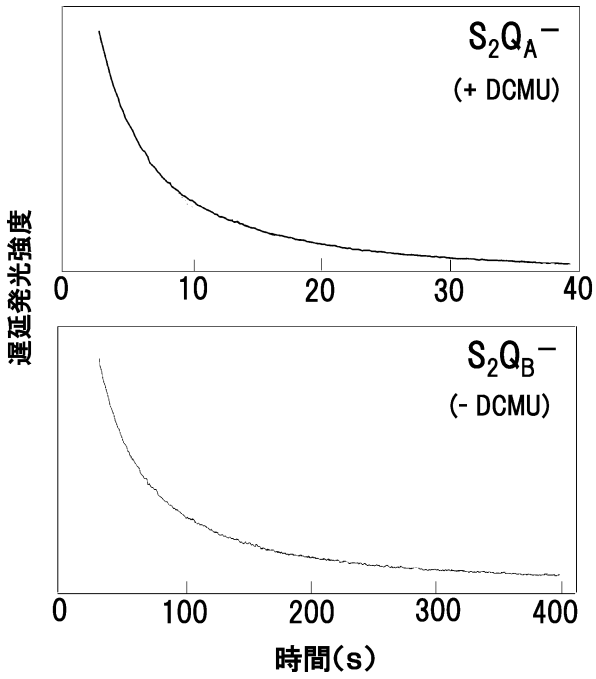



図10：$S_2Q_A^-$ と $S_2Q_B^-$ 再結合に由来する遅延発光減衰曲線
十分に暗順応した葉緑体をDCMU存在下（上）又は，DCMU非存在下（下）で1閃光照射した．15°Cで測定．

## 2.b.9　熱力学的パラメーターの算出

様々なモデルに基いた理論式を用い，熱発光と遅延発光をフィッティングし，発光に関与する分離電荷対再結合の熱力学的パラメーターを求める事ができる．詳細についてはそれぞれの文献を参照されたい[8,24,38−42]．

## 2.b.10　試料

葉緑体標品や光化学系II膜標品，シアノバクテリアや藻類細胞など溶液中に分散している試料は，固定タイプの試料ホルダーの試料用のくぼみに直接のせる．筆者が用いている可動タイプの試料ホルダーでは，試料（～200 μg Chl/ml），～70 μlをピペットでろ紙（15 mm×15 mm）に浸み込ませ，アルミ板とアクリル板の間にはさみ込む．～20 μg Chl/ml程度の試料でも十分に測定可能である．生葉などは葉脈などが少ない部分を選び，リーフパンチ（または，コルクボーラー）で打ち抜いたものを直接ホルダーにのせる．試料葉がホルダーに密着するように注意する．生葉をDCMUなどの薬剤で処理したい場合は，薬剤が入った溶液中で真空浸透（vacume infiltration）する．軽く減圧後，急に常圧に戻すことを数回

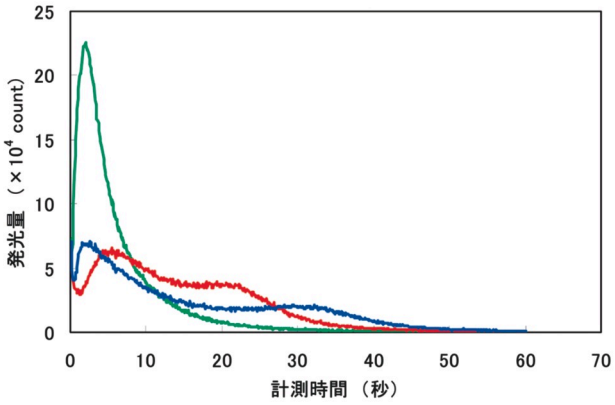



図11：シアノバクテリア細胞における遅延発光減衰曲線
好熱性シアノバクテリア（*Thermosynechococcus elongatus*）細胞（5 μgChl/ml）を赤色光（700 nm）で照射（緑），白色光で30秒間照射→赤色光（700 nm）で照射（赤），白色光で30秒間照射→5秒暗→赤色光（700 nm）で照射（青）した後，遅延発光測定装置（浜松ホトニクス：PMX-6100）で遅延発光減衰曲線を測定．（勝又，小野　未発表）

行う．葉の表皮を剝いて薬剤が入りの溶液中に浸してもよい．

## 2.b.11　熱発光測定に際しての留意点

1）熱発光バンドのピーク温度は，装置によってばらつく．実際の試料温度と温度測定用熱電対が示す温度は必ずしも一致しない．また，試料が均一に加熱されず，試料中に温度のばらつきや勾配ができるとバンドの形などに影響を与える．しかし，理論式に従ってバンドのフィッティングを行い，熱力学的パラメーターなどを求める場合などを除いては，通常の使用ではあまり問題とならない．

2）熱発光バンドのピーク温度は pH により変化する．生葉で熱発光を測定する場合，凍結，加熱により細胞組織が破壊される為，単離葉緑体で測定した場合と異なる温度にバンドが現われる場合がある．

3）熱発光バンドのピーク温度は昇温速度によって変化する．高い昇温速度ではより高い温度にピークが現われる．

4）凍った試料の融解に伴い昇温速度が変化するため，0 °C近傍に現われる熱発光ピークが歪んだり，偽のピークが現われることがある．溶液に凍結防止剤として～25%(v/v) 程度の glycerol を添加することにより改善することができる．

5）光照射する前に試料を十分暗順応させる．暗順応に必要な時間（と温度）は，測定しようとする熱発光バンドにより異なる．

6）ある処理や条件下で熱発光バンドのピーク温度や形が変化した場合，変化が系 II の酸化側の正電荷キャリアーと還元側の負電荷キャリアーのどちら側（又は両側）に由来するかは原理的にわからない．すなわち，$S_2Q_B^-$ 再結合由来の $B_1$-バンドのピーク温度が変化した場合，これが $S_2$ の性質の変化に由来するものか，$Q_B$ の性質の変化に由来するものかを区別する事は出来ない．しかし，$Q_B$ の性質が変わった場合は $S_2Q_A^-$ 再結合に由来する Q-バンドには変化が現われず，$S_2$ の性質が変わった場合は Q-バンドにも同じような変化が現われる可能性が高い．

7）熱発光測定に使用した試料は，通常，凍結と加熱により生理学的な活性を失っている．

## 参考文献


1）P. V. Sane & A. W. Rutherford, Light Emission by Plants and Bacteria, eds. J. Amesz & D. C. Fork, Academic Press, Orlando, 1986, P.329.

2）S. Demeter & Govindjee, *Physiolgia Plantarum*. **75** (1989) P.121.

3）I. Vass & Y. Inoue, The Photosystems: Structure, function and Molecular Biology, ed. J. Barber, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1992, P.259.

4）Y. Inoue, Biophysical Techniqes in Photosynthesis, eds. J. Amesz & A. J. Hoff, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1996, P.93.

5）I. Vass &, *Photosyn. Res*. **48** (1996) P.117.

6）J. M. Ducruet, *Exp. Bot*. **54** (2003) P.2419.

7）I. Vass, *Photosyn. Res*. **76** (2003) P.303.

8）E. Tyysjärvi & I. Vass, Chlorophyll a Fluorescence: A Signature of Photosynthesis, eds. G. Papageorgiou & Govindjee, Springer, Dordrecht, 2004, P.363.

9）P. V. Sane, Photosynthesis Research Protocols, ed. R. Carpentier, Humana Press, Totowa, 2004, P.229.

10）D. E. Fleishman & B. C. Mayne, Curr. *Topics Bioenerg*. **5** (1973) P.77.

11）J. Lavorel, Bioenergetics of Photosynthesis, ed. Govindjee, Academic Press, New York, 1975, P.223

12）S. Malkin, Primary Process of Photosynthesis, ed. J. Baber, Elsevier, Amsterdam, 1977, P.349.

13）J. Amesz & H. J. van Gorkom, *Ann. Rev. Plant Physiol*. **29**, P.47.

14）Govindjee & P. A. Jursinic, Photochemical and Photobiological Reviews, ed. K. C. Smith, Vol. 4, Plenum Press, New York, 1979, P.125.

15）P. A. Jursinic, Light Emission by Plants and Bacteria, eds. J. Amesz & D. C. Fork, Academic Press, Orlando, 1986, P.291.

16）H. J. van Gorkom, *Photosyn. Res*. **48** (1996) P.107.

17）A. Sonneveld, L. N. M. Duysens, A. Moerdijk, *Biochim. Biophys. Acta* **636** (1981) P.39.

18）Y. N. Kaurov, G. E. Aksyonova, E. R. Lovyagina, T. V. Veselova, I. I. Ivanov, *Biochim. Biophys. Acta* **1143** (1993) P.97.

19）S. Itoh, N. Murata, A. Takamiya, *Biochim. Biophys. Acta* **245** (1971) P.109.

20）U. Bodemer, V. Gerhardt, Y. Z. Yacobi, Z. Zohary, G. Friedrich, M. Pohlmann, *Archiv. Für. Hydrobiologie*. Special Issues Adv. Limnol. **55** (2000) P.87.

21）M. Katsumata, T. Koike, M. Nishikawa, H. Tsuchiya, *J. Jap. Soc. Water Envi*. **28** (2005) P.23.

22）M. Katsumata, T. Ayano, K. Kazumura, T. Koike, *J. Photochem. Photobiol*. B **90** (2008) p.152.

23）C. Wang, D. Xing, Q. Chen, Biosens. Bioelect. **20** (2004) P.454.

24）W. Arnold & J. R. Azzi, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **61** (1968) P.29.

25）A. W. Rutherfod, A. R. Croft, Y. Inoue, *Biochim. Bio-*

*phys. Acta* **682** (1982) P.457.
26) A. B. Rubin & P. S. Venediktov, *Biofiz*. **14** (1969) P.105.
27) S. Demeter, Z. S. Rőzsa, I. Vass, E. Hideg, *Biochim. Biophys. Acta* **809** (1985) P.379
28) Y, Inoue, T, Yamashita, Y, Kobayashi, K, Shibata, *FEBS Lett*. **82** (1977) P.303.
29) T, Ono & Y. Inoue, *FEBS Lett*. **278** (1991) P.183.
30) T. Miranda & J.-M. Ducruet, *Plant Physiol. Biochem*. **33** (1995) P.689.
31) S. Demeter, C. Goussias, G, Bernát, L. Kovács, V. Petrouleas, *FEBS Lett*. **336** (1993) P.352.
32) T. Ichikawa, Y. Inoue, K. Shibata, *Biochim. Biophys. Acta* **408** (1975) P.228.
33) K. Sonoike, H. Koike, I. Enami, Y. Inoue, *Biochim. Biophys. Acta* **1058** (1991) P.121.
34) T. Noguchi, Y. Inoue, K. Sonoike, *Biochim. Biophys. Acta* **1141** (1992) P.18.
35) P. V. Sane, T. S. Desai, V. G. Tatake, Govindjee, *Photochem. Photobiol*. **26** (1977) P.33.
36) I. Vass, D. J. Chapman, J. Barber, *Photosynth. Res*. **22** (1989) P.295.
37) J.-M. Ducruet & D. V. Vavilin, *Free Radc. Res*. **31** (1999) P.187.
38) J. T. Randall & M. H. F. Wilkins, *Proc. R. Soc. London* Ser. A **184** (1945) P.366.
39) I. Vass, G. Horvath, T. Herczeg, S. Demeter, *Biochim. Biophys. Acta* **634** (1981) P.140.
40) D. de Vault, Govindjee, W. Arnold, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **80** (1983) P.983.
41) D. de Vault & Govindjee, *Photosynth. Res*. **24** (1990) P. 175.
42) P. B. Vidyasagar, S. Thomas, M. Banerjee, U. Hedge, A. D. Shaligram, J. *Photobiochem. Photobiol*. B**19** (1993) P.125.

# 2．分光測定法
## c．閃光分光法と差スペクトル

伊藤　　繁[1)]

光合成に使われる閃光分光法による差スペクトル測定の原理，実験装置の説明をした．実験例として植物，アカリオクロリス(シアノバクテリア)，ヘリオバクテリア，クロロビウムのI型反応中心質複合体と光センサー蛋白質 AnPixJ の吸収時間変化と時間分解差スペクトル測定を紹介した．

## Flash photlysis of photosynthetic systems

Shigeru Itoh

Principals and apparata of flash-photolysis measurement sytems are reviewed.　Meareuments of flash-induced absorption changes of chlorophylls in type-I reaction centers of plant, *Acaryochloris marina, Heliobacterium, Chlorobium* and of a color sensor protein in cyanobacteria are interpreted.

### 2.c　はじめに

アンテナ色素に吸収された光は．反応中心タンパク質中のクロロフィルに渡され，電荷分離がおこる．ほとんどの電子伝達成分は非アミノ酸で，酸化還元反応に伴い特徴的な吸収スペクトルの変化を示す．閃光分光法は，光反応をキセノンフラッシュランプあるいはレーザ閃光照射で開始し，各成分特有の吸収スペクトル変化（差スペクトル）を検出するので光合成研究に最適の方法である．試料を透過した測定光量の変化を高感度，高速に測定することで，反応や速度を直接決定できる．

### 2.c.1　測定原理と差スペクトル

分光法では，試料に測定光 $I_0$ を照射し，透過光強度 I を測り試料中の物質量を計測する．試料が吸収する光量は Lambert-Beer の法則に従い試料中の光吸収分子の対象波長での分子吸光係数 $\varepsilon$ と光路長 (L)，分子濃度 C に比例する．吸光度 A は常用対数を使うと

$$A=\log(I_0/I)=\varepsilon\ CL \qquad (1)$$

($\varepsilon$ は分子吸収係数で分子固有の値，C はモル濃度，L は光路長)であり，$\varepsilon$ 既知の物質の濃度を簡単に決定できる．図1は，閃光分光法の原理を示す．ある分子種が酸化（あるいは還元）され吸光係数が変化する時，その差分子吸光係数（$\Delta\varepsilon$）が既知ならば，濃度変化 $\Delta C$ は吸光度変化 $\Delta A$ と

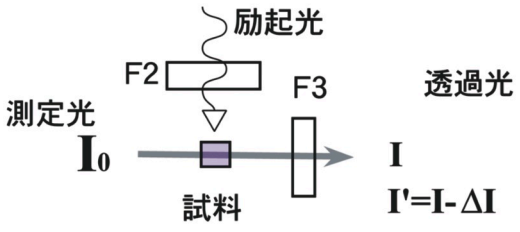
$$\Delta A=\Delta\varepsilon\ \Delta CL \qquad (2)$$

の関係となり，閃光照射前後での（明－暗）吸光度変化 $\Delta A_{L-D}$ を測定すれば濃度変化がわかる．これには，閃光照射前後の透過光量 I と I' を測定すれば良い．

$$\Delta A_{L-D}=\log(I_0/I')-\log(I_0/I)=\Delta\varepsilon\ \Delta CL \qquad (3)$$

従って混在する他の物質やその濃度を測定しなくとも(知らなくとも)，光応答する対象分子の反応量や反応速度を実測できる．$\Delta\varepsilon$ 未知物質についても差スペクトルや時間経過は測定できるので，反応過程を容易に非破壊的に追う事が出来る．他手段で分子数を推定できれば，$\Delta\varepsilon$ も決定できる．閃光光源，レーザ，計算機，検出器である光電子増倍管などの発達がもたらした閃光分光法の発展により光合成研究は大きく進んだ．

測定上の注意点は，特定波長の光について I, I' を正確




$$\Delta A_{L\text{-}D}=log(I_0/I')-log(I_0/I)=log(I/I')$$
$$=log(I/(I-\Delta I))=\Delta\varepsilon\ \cdot\Delta C\cdot L$$

図1：閃光分光法の原理と吸光度変化の計算．
F 2，F 3 は光学フィルター

1）名古屋大学大学院理学研究科物質理学専攻物理

に測定することにつきる．例えば，励起用の閃光が受光部にもれたり，試料の光散乱が変わったり（濁ったり）すると，IとI'の比を正しく測定できない．これを避けるために，測定領域の光は通すが，閃光は通さないような光学フィルターや，分光器を受光器の前におく．

吸光度変化量は，受光器の出力電圧変化から計算する．たとえば700 nmで，L＝1 cm，IとI'が1 Vと1.01 V（透過率1％増）の出力変化を生んだと測定されれば $\Delta A_{L-D} = -\log(I'/I) = -\log(1.11/1) = -\log(1.11) = -0.00432$ の吸光度減少となり，700 nmでの $\Delta\varepsilon$ が64 $mM^{-1}cm^{-1}$ の分子（例えばP700）の反応なら式（3）より $\Delta C = -0.00432/64\ mM^{-1}cm^{-1}/1\ cm = 0.000068\ mM = 0.068\ \mu M$ の変化となる．波長ごとの測定から，差スペクトルを得て反応分子を同定したり，その量，変化，加えた試料の量や反応条件との関係を調べる．

## 2.c.2　多様な電子伝達成分

表1に植物型光合成に働く主な電子伝達成分の名称，分光特性と酸化還元電位，反応速度（反応全般は文献[3]参照）を示す．電子伝達成分近傍のクロロフィルや，カロテノイドなども局所的な電場変化や，膜内外液相間での膜電位に応じてスペクトル変化を示す．これらの詳細については光合成関連の教科書などを参照されたい．

## 2.c.3　測定装置

実際に使われているいくつかの閃光分光装置を図2に示し，その特性を以下に示す．

**表1**：植物光合成初期反応に関わる成分の分光的特徴
吸収帯のred oxは還元と酸化型での吸収ピークを示す．（　）内は差分子吸光係数

| 反応部位 | 分子名 | 吸収波長 nm（吸光係数 $mM^{-1}cm^{-1}$） | 酸化還元電位（V） | 反応速度 | 参考になる文献 |
|---|---|---|---|---|---|
| PSI電子供与体Chl *a* | P700 | 700 red(64)<br>430 red(44)<br>810 ox(8) | 0.43-0.46 | 光酸化3-10 ps<br>暗還元0.1，1，30 ms | 1，7 |
| PSI電子受容体Chl *a* | A0 | 686 red | ～－1.0 | 光還元3-10 ps<br>暗酸化30 ps | 13 |
| PSI電子受容体キノン | A1：フィロキノンQK | 390 red | ～－0.8 | 光還元30 ps，Fxによる酸化ns，P700と0，2 ms | 3，13 |
| PSI電子受容体鉄硫黄センター | A2＝Fx | 430 red（11） | ～－0.7 | 光還元25-200 ns<br>P700による酸化1 ms | 1，3 |
| PSI電子受容体鉄硫黄センター | P430（＝FB，FA） | 430 red（11）460 ox | ～－0.48 | 光還元～200 ns P700による酸化30 ms | 1，6-8 |
| P700への電子供与体 | プラストシアニン | 460，597 ox（4.9），770 ox | ＋0.37 | 光酸化0.01～0.2 ms | 9，10 |
| PSII電子供与体Chl *a* | P680 | 680 red<br>410，825 ox(7) | ～＋1.0 | 光酸化～ ps<br>暗還元1-200 $\mu$s | 4，10 |
| PSII電子受容体 | フェオフィチン *a* | 410，680<br>546 red | ～－0.4 | 光還元～ ps<br>暗酸化200 ns | |
| PSII電子受容体 | $Q_A$（プラストキノン） | 270 ox，320 red(13) | ～0 | 光還元200 ns | 5，6，12 |
| PSII電子受容体 | $Q_B$（プラストとキノン） | | ～0.1 | 光還元200 $\mu$s | 5，6，12 |
| PSII | シトクロムb 559 | 429，539，559 red<br>415 ox | 0.35 | ～20-30 ms | 1，6 |
| b 6/f複合体中 | シトクロム *b* 6 | 434，536，563 red<br>（A 563－600＝21）<br>413，ox | －0.08 | | 1，5，6 |
| b 6/f複合体中 | シトクロム *f* | 421，522，553，6（28）red，410 ox | ＋0,365<br>(pH 7.8) | | 1，5，6 |
| b 6/f複合体中 | Rieske-FeS | ESRで測定 | 0.29 | | 5，6 |
| 膜電位感受性 | 515nmカロテノイド変化 | 518＋，480－でチラコイド膜内側正の膜電位変化 | | 光での立ち上がり<br>＜20 ns | 11 |

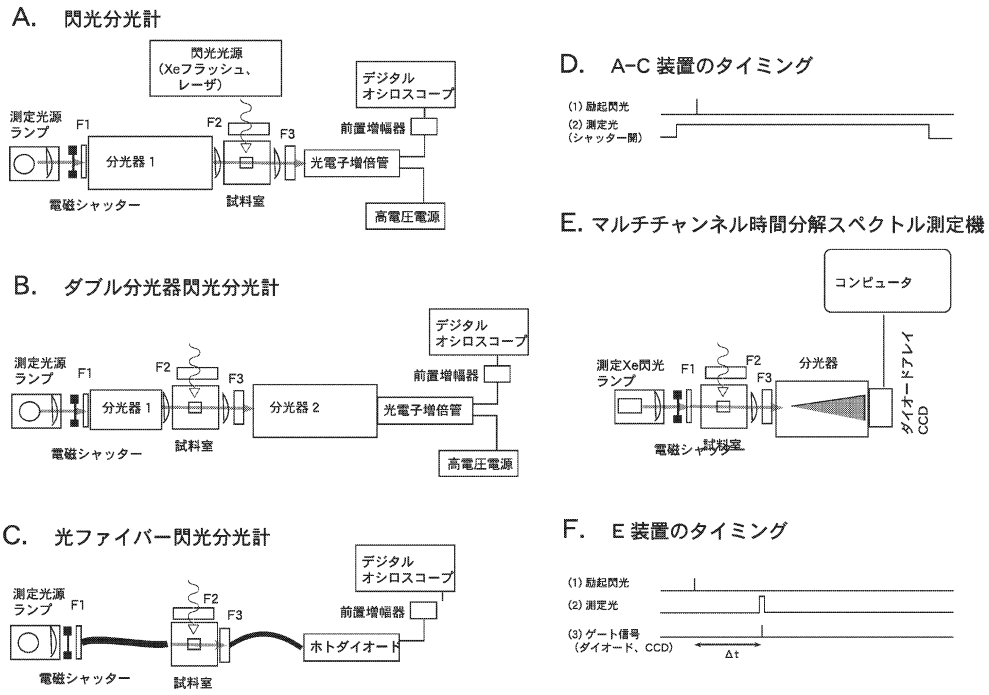



図 2：各種閃光分光装置の概略（F 1，F 2，F 3 は光学フィルター）

### A．閃光分光装置標準型（濁った試料も測れるが，蛍光が強い試料は困難）

概略：直流点灯の光源ランプ（可視 ── 近赤外光領域ではハロゲンランプ，紫外部では Xe 放電管など）からでた光を光学フィルター F 1 と分光器 1 で必要な波長光のみ取り出し，試料にあて，パルスレーザ（または Xe フラッシュランプ）からの励起光で引き起こされる吸光度変化を光電子増倍管で検出される光電流の増減として測定する．電流はプリアンプで増幅し，デジタルオシロスコープで記録する．測定光は D に示すようなタイミング（コンピュータあるいは専用パルスジェネレータで制御）でレーザ照射に同期させて電磁シャッターを開閉することで，閃光照射前に試料にあて，測定終了後は消す．これにより，試料に不必要な光反応が起こるのを防ぐ（電磁シャッターの振動が測定系に余分なノイズを与えないように注意する）．（このような測定系は東京インスツルメンツ，堀場製作所，などで得られるが，注文生産）．

光学フィルター：F 1 は分光器の 2 次光カット用で F 3 があればなくともよい．F 2 は励起光を必要な波長のみに限定するガラス光学フィルターで，波長精度が良いレーザ励起時には無くても可（しかし，レーザ励起用のフラッシュ光などが漏れる事もあるので注意）．F 3 は励起光が光電子増倍管にはいるのを防ぐためで，重要．光合成では，通常 1 %以下の吸光度変化（存在する被測定分子の濃度と分子吸収係数から計算できる）しか期待できないので，測定光より 2 － 3 桁強い励起光が 0.1%もれても測定に大きく影響する．これを改善するために長波長や短波長光カット用の色ガラスフィルターや干渉フィルター，レーザ波長だけを通さないノッチフィルターなどを使用する．2 枚以上を組み合わせてもよい．励起光で生じるクロロフィル蛍光なども測定を阻害する．ただし，励起光や蛍光の影響は，励起時間だけのもので，長時間の測定ではあまり問題にならない．また，増幅系の時定数を遅くして測定すると，その時定数に合わせて励起光によるノイズが観測される．反応を引き起こさない範囲で測定光強度をあげ，繰り返し測定を行い，信号を積算することで，S/N 比を上げる．フィルターが強い蛍光を発する場合もあるので注意する．（色ガラス，干渉フィルターともメーカー多数あり，価格は数千円－20 万円/ 1 枚）

検出器：光電子増倍管は多種あり，それぞれ紫外，青，赤，近赤外などの感度に特徴がある．測定波長で感度が高い事を確認する．励起波長域で感度が低く，測定波長域で高い検出器が良い．たとえば，シトクロムなどを測定する時は赤感度のない管を使用し，赤色部のククロロフィル吸収帯を励起する事で，蛍光や励起光によるノイズの少ない測定ができる．一方，P 700 のようなクロロフィルの吸収変化を測定する時には赤感度の高い管が必要となる．化学物質の光反応では赤や近赤外には感度が低い検出器を使用することが多い．電圧を印可したまま

光電子増倍管に強光を照射すると損傷するので注意する．300-1000 V の安定化電源が必要．(浜松ホトニクスのカタログなど参照)．

プリアンプ：光電子増倍管の出力は直接オシロスコープにつなぐ事も可能だが，電流が少ないので，簡単な電流増幅用のプリアンプで増幅したあとさらにもう一段オフセット電圧を加える増幅器を使用する（市販の 100 MHz 程度の高速汎用安価なオペアンプによる自作も容易．電源ノイズや発振などに注意する．スイッチング電源は GHz 程度の早いノイズがあるので，100 $\mu$s 以下の測定では使用しない)．ごく小さな変化量（１％以下）を拡大して増幅記録するためにオフセット電圧を引加し，信号変化範囲を 0 V 付近に限定することでデジタル分解能を最大限利用して S/N よく記録できる．たとえば 10 ビット分解能のデジタルオシロに入力すると，1/1024＝0.1%以下の信号差は全く記録できないはずであるが，実際にはオフセット電圧の利用や多数回の信号積算により分解能があがり，必要精度を得られる．(岩通，テクトロ，など色々　数十万円)

光源と分光器と回折格子；目的の波長精度にあわせて選定する．通常 1 nm 程度の精度がえられれば十分で 15-50 cm の分光器が一般的．既存のスペクトロメータから取り出してもよいが，一番重要なのは明るさ．波長精度と光量がいる．分光器はニコン，島津，日本分光，など多数あり，使用波長範囲で明るいものを選ぶ．閃光分光での最重要点は明るさであり，ランプとの組み合わせが重要．光源は高安定化直流電源で点灯し，分光器の細いスリットに焦点を合わせるので，100 W 程度の小さく高輝度（青部分で重要）のフィラメントのハロゲンランプが良い．やや低い電圧で新しいものを使用して変動を減らす．ランプの冷却ファンはノイズをだすので止める．Xe ランプは高輝度だが，直流点灯でも発光量，発光部位の変動が大きく紫外部(レンズ系を石英にする必要あり)以外ではメリット少ない．

試料室；試料は通常の 1 x 1 x 4 cm のガラスセル中にいれるのが便利．試料ホルダーは水循環などで温度制御したりマグネットスターラーなどで撹拌できると便利である．試料室中，あるいは外にガラスフィルターを取り付ける．我々はやや大きめの 25 cm 角の試料室を使用しているが，手をいれることが出来るので，低温測定用のクライオスタット（Oxford など）もいれられ，使い勝手はよい．既成の分光器の一部を取り外しても良い．我々は，鉄板上に，マグネットで，分光器，試料室，検出器を固定してA，B兼用型として使用している．装置 A-D では防振台などは特に必要ない．

閃光光源；キセノン閃光光源(発光時間 1-50 ミクロ秒程度)，やパルスレーザ（発光時間 10-20 ナノ秒）を使用する．前者は簡便で幅広い発光スペクトルで，ガラス分光フィルターや干渉フィルターと組み合わせ，様々な波長での励起が可能である．発光時間が長く，発光スペクトルが広いことが便利だが同時に迷光をうみ，検出を妨げる．例えば波長範囲 400-700 nm でのクロロフィル吸収変化の測定では，600 nm 以上の測定にはフィルターを閃光光源につけ 500 nm 以下の Soret 帯のみを励起する，600 nm 以下の測定には 650 nm 以上のみを励起するような工夫が必要で，しかも（光強度と吸収帯とできまる)励起効率も異なる．最も普及している Nd-YAG レーザの 2 倍波（20 ns，532 nm）で励起するなら，検出器側に 532 nm＋－20 nm 程度を通さないノッチフィルターをいれると，これ以外のほぼ全波長で測定可能となる．しかも，短い閃光時間により高速過程の測定が出来る．さらに，色素レーザ(色素により，500-700 nm)，チタンサファイヤレーザ(700-900 nm 可変)などを加え，異なった波長域を励起できれば更に便利だが，費用がかかる．

### B．ダブル分光器型閃光分光装置（透明試料や，蛍光を出す試料に適している)．

上記A装置とは逆に試料の後に主分光器 (2) をとりつければ試料の蛍光を取り除ける．クロロフィル蛍光と重なる波長域の測定（例えば P 700）の測定にはこの配置がよい．試料にあてる測定光量をへらし，波長精度をあげるために，副分光器 (1) も使うが，これは明るく小さなもので良い．この代わりに特定波長光を透過するバンドパスフィルターや干渉フィルターなどを使用してもよい．試料に当たる測定光が強すぎないようにする（光応答信号量を測定光量を変えてはかり，減らない事を確認する)．光が試料を透過後に主分光器 2 に入れるので，試料が透明でないと，光電子増陪管に到達する光量が減少してしまい，ノイズが増え測定困難となる．濁った試料(例えば植物葉緑体チラコイド膜，細菌細胞，葉，など)には散乱に強いA型が，表面活性剤処理で分離精製した透明な光化学系Ⅰ，Ⅱ標品やアンテナ蛋白質，バクテリア反応中心などや，蛍光の強い試料にはB型が適している．

### C．光ファイバー型分光装置．

A，B，型での分光器の役割を干渉フィルターで置き換え，光路を光ファイバーに置き換え，検出器をダイオードにすることで，簡便で安定，必要なら移動可能な装置を作る事ができる．F 1 を小型分光器にしても良い．差ス

ペクトルが明らかな特定の成分（例えばP 700やカロテノイドシフト）の時間変化だけを測りたい場合に良い．市販品もある．（例えばPAM蛍光測定装置の付属品）．励起光も光ファイバーを通して与える事が可能である．試料に検出器側の光ファイバーを近づけることで，濁った試料（たとえば葉など）でも測定ができる．この際には，励起光や散乱光の影響を除くために，フィルターや測定時間などに注意する．

### D．A-C装置の測定時系列例．

励起閃光照射の直前に光路中の電磁シャッターをあけ，信号を測定する．測定後はシャッターを閉じておくことで，試料の暗回復をはかり，より強い測定光でも問題なく測定できるようにする．デジタルオシロスコープでの記録はシャッター解放と閃光照射時からシャッター閉鎖直前までにおこなう．タイミングの調製には，専用のパルス発生機（我々は50 psで設定可能なスタンフォードリサーチ社製DG535を使用）を用いて，シャッターの解放，測定の開始，レーザの照射，シャッター閉鎖のシークエンスを制御する．これを1-1000回程度繰り返し，信号積算することで，S/N比の高い測定ができる．測定時間や，繰り返し時間は目的信号の特性と試料の暗所回復時間などの条件毎に検討して，信号強度が最大になるように設定する．

### E．マルチチャンネル時間分解スペクトル測定装置

A-Cでは，特定波長での透過光強度を測定し，その変化量を波長を変えて測定することで，変化成分の差吸収スペクトルを得る．これと反対に，レーザ閃光後の特定時間での吸収スペクトル（時間分解スペクトル）を直接得る．タイミングを変化させて沢山の時間分解スペクトルを得た後，時間変化を判定する．本装置では，閃光照射後の特定時間に，測定光を白色閃光として与え，透過光を分光器にいれ，分光後の光量をダイオードアレイ検出機やCCD検出器で波長全域での時間分解スペクトルとして一度に検出する．このタイミングを変えることで，励起レーザ閃光照射前後の広範囲の時間での時間分解スペクトルを得る．暗所でも出る熱ノイズを減らすため，−20から−80°C程度の冷却器付きのダイオードアレイやCCDを用いる．パルスレーザで励起し，測定光はXe閃光から得る．後者の発光時間（1ミクロ秒程度）に応じた時間分解を行う場合と，さらにCCDやダイオードアレイの前に取り付けたイメージインテンシファイヤーをゲート電気信号で制御して10ナノ秒程度の分解能での時間分解スペクトルを取る方法がある．多波長を同時に測定して時間分解スペクトルを直接得られるのが特徴であるが，その分検出器が小さいので光量がへり，S/Nは落ちる．Bと同様に濁った試料の測定には向かない．同じ装置で測定光をつけなければ蛍光スペクトルもとれる利点があり，透明である程度大きな信号が期待される精製反応中心試料などの測定に向いている．一方信号の小さい（差吸光係数の小さな）分子の反応などにはあまり向かない．ランプの時間による揺れなどでベースラインのずれも起こりやすい．

この測定では励起レーザ光と，測定用閃光，ゲート制御信号のタイミングがきわめて重要となる．Gに示すようにレーザ光と，測定閃光間の時間を設定し，積算を行い，時間分解スペクトルを得る。時間を変えて行くことで反応を追う．

### F．ピコ秒時間分解スペクトル測定装置

ナノ秒以下の分光測定では，電気的な方法での時間制御は困難であり，光速と距離の関数として時間を決める方法をとる．光源として，数ピコ秒〜数十フェムト秒のレーザ閃光を用いる．この閃光を偏光ビームスプリッターで2つに分け，一方は励起光として試料にあて，もう一方は，$CS_2$溶液や$D_2O$などに当てて白色光を作り出し，これを測定光として使う．測定光の光路長を移動ステージ上のミラー対により変化させて，試料への到達時間を励起光とはずらしていく．光検出器としてはDと同様に分光器とダイオードアレイやCCDの組み合わせを用い，励起光と測定光の時間差を変えつつ時間分解スペクトルを得る．レーザ閃光の幅で時間分解能がきまる．時間分解能が高い（測定光照射時間が短い）と得られる光量が減るので，多数回の積算が必要となる．このため励起レーザの繰り返しも早くなるので，試料損傷も起こりやすくなる．これを防ぐために，フローセルによる試料の循環，冷却などを行う．数ナノ秒以下の時間範囲ではアンテナクロロフィルの励起状態生成による吸収変化や，レーザ光照射による蛍光誘導放出などが起こるのでこれらの影響も考慮して時間分解スペクトルを解釈する必要がある．測定試料溶液の酸化還元電位の制御なども行い，電子移動に伴う吸収変化と励起状態による吸収変化（こちらは酸化還元状態に依存しない）を分けることも行い，目的対象のスペクトル変化を得る．Fに示す時間系列と同様だが，受光器のゲート信号による感度制御は不要となる．

## 2.c.4　測定例 1：閃光で誘起される吸光度変化の時間変化と差スペクトル

装置Bによる，クロロフィル *d* を主要色素として持つシアノバクテリア，アカリオクロリスより単離したチラコイド膜上の光化学系 I 反応中心クロロフィル P 740 の光酸化と暗回復の測定（図 3）．文献[14] 参照．

試料，アカリオクロリスをビーズビーターで破砕し，超遠心分離機により分画したチラコイド膜．反応液：50 mM Tris 緩衝液 pH 7.5，20 mM NaCl，さらにアスコルビン酸 10 mM，DCIP 0.1 mM を添加して P 740 を前もって還元しておく．室温．励起光は NdYAG レーザ 2 倍波 532 nm，10 ns パルス幅，0.25 Hz 繰り返し，吸収変化が 90%飽和するレーザ強度に設定．32-256 回積算．

閃光照射で引き起こされる各波長での吸収の時間変化を測定した（図 3）．P 740 の時間変化は遅いので ms 領域のみを表示．1 ms 以内では 725 nm に一部見られるように PSII の反応中心クロロフィル（2009 年時点ではクロロフィル *d* か *a* か論争中）の半減期 200 $\mu$s の変化が重なる．波長ごとに変化の大きさ，方向が変化する．このうち遅い部分（2 ms での変化量）の大きさを波長に対して示すと図 4 下の P 740（還元－光酸化）の差スペクトルが得られる．この差スペクトルは 460 nm と 740 nm に吸収減少の極大を示し，430 nm と 700 nm に正の極大を示す P 700（ホウレンソウなどのようにクロロフィル *a* をもつ通常の植物やシアノバクテリアの光化学 I の反応中心クロロフィル *a* 2 量体）とはことなっていた．この差スペクトルからアカリオクロリスの光化学系 I でクロロフィル *d* の 2 量体が反応していることがわかり，酸素発生型の光合成でもクロロフィル *a* 以外のクロロフィルが電子供与体として働くことが初めて示された．反応時間の違い，試料の酸化還元状態の制御で吸収変化を与える成分の特定や反応が検討できる．

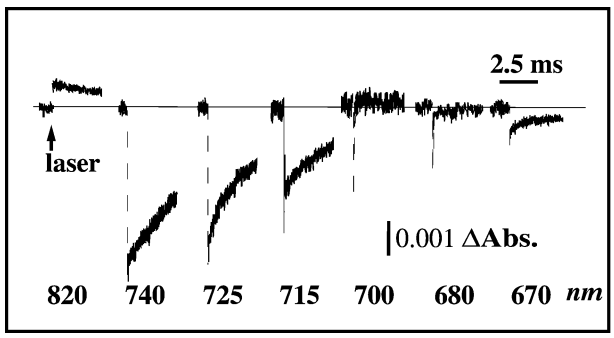



**図 3**：アカリオクロリスチラコイド膜閃光照射時の吸収変化[14]

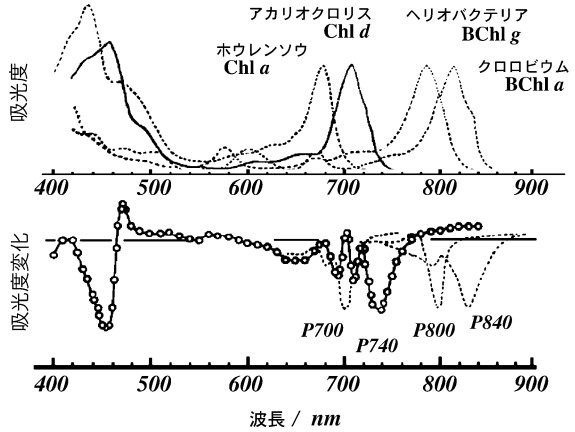



**図 4**：ホウレンソウとアカリオクロリスの光化学系 I，ヘリオバクテリア，クロロビウムの反応中心色素複合体の吸収スペクトル（上）とレーザ誘起された各電子供与体の差スペクトル（下）．P 740 差スペクトルは図 3 の結果から作成[14]

図 4 に，絶対嫌気性細菌と植物，アカリオクロリス各々から精製された I 型反応中心複合体の吸収スペクトルと反応中心クロロフィルの光誘起差スペクトルを示した．クロロフィル *a* をもつホウレンソウの光化学系 I は P 700，クロロフィル *d* をもつアカリオクロリスの光化学系 I は P 740，バクテリオクロロフィル *g* をもつヘリオバクテリアの反応中心は P 800，バクテリオクロロフィル *a* をもつフロロビウムの反応中心は P 840 とよばれ，それぞれ異なったクロロフィルの 2 量体が電子供与体として働く．各反応中心複合体は 100-50 分子のアンテナクロフィルと 1 分子の電子供与体（クロロフィル 2 量体）を持ち，特徴的なスペクトルを与える．反応中心クロロフィルはアンテナクロロフィルの長波長側に吸収帯を持ち励起エネルギーを集め光反応を行う．多数のアンテナクロロフィル中でも，光酸化をする各電子供与体の異なる差スペクトルだけが閃光分光法では測定できる．また差スペクトルは近傍クロロフィルのシフトによる吸収変化もふくみ，時間範囲を変えると違う成分の反応も見えてくる．

## 2.c.5　測定例 2：時間分解差スペクトルの実測

ゲート CCD 分光システム（図 2 E）によるシアノバクテリア光センサータンパク質 AnPixJ の時間分解スペクトルの測定（図 5）．

試料　大腸菌で発現精製した，シアノバクテリア光センサータンパク質 AnPixJ．図 5 上に示すように，この蛋白質は赤と緑に吸収帯を持つ Pr と Pg の 2 状態を示す．光照射で状態間の遷移が起こり，シアノバクテリアの走

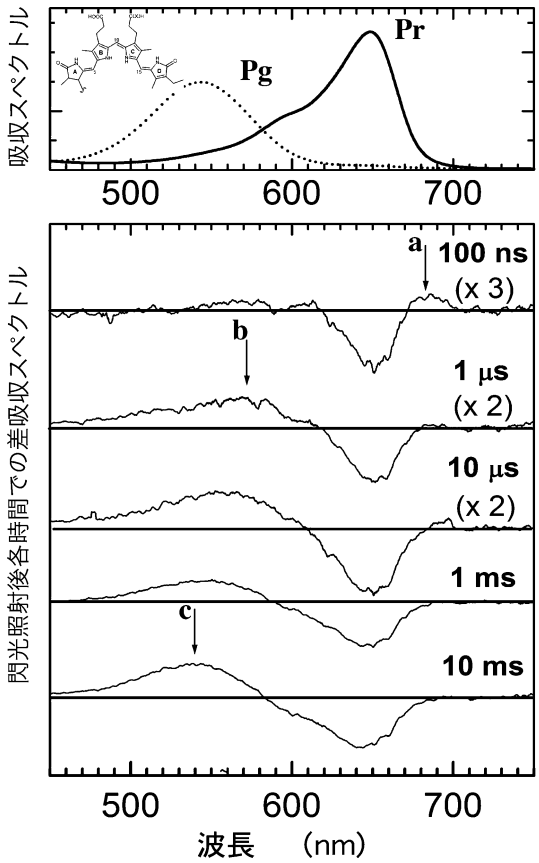



**図5**：シアノバクテリア光センサー蛋白質 AnPixJ の光反応に伴う差スペクトルの変化[15]

光性を制御する光センサーとして機能する．

測定装置，Pr から Pg への遷移を，反応開始用レーザ閃光として，固体体色素レーザ(Solar)，10 ナノ秒閃光，650 nm を使用(Nd-YAG レーザ 2 倍波 532 nm，10 ns を変換)．測定光はキセノン閃光 1 ミクロ秒白色光．受光器はオリエール社製ゲートイメージインテンシファイヤー付き冷却 CCD，分光器はオリエール 30 cm 分光器．

励起用レーザ閃光照射に同期して，図 G に示すように一定時間ずらしたキセノン閃光(測定光) 1 ミクロ秒を照射し，そのピーク時間でイメージインテンシファイヤーを 10–50 ナノ秒ゲート信号で作動させ，I，I' を測定し，差スペクトルを計算した．繰り返し間隔 5 秒，測定をしない 4 秒間は緑色 LED 照射で，試料を Pr 状態に保持した．ゲート信号の時間を変えて得た時間分解スペクトルを示す．

レーザ閃光照射後 100 ns 以内に，650 nm に負の吸収変化，同時にその超波長側に吸収増大が起こる．これは 650 nm の Pr 型の基底状態の吸収帯が消失し，660–70 nm(a) に新吸収帯が出現 (長波長シフト) した事を示す．次に 1 μs の時点では逆に短波長側 570 nm(b) に吸収帯が移る(短波長シフト)，更に 10 ms 後にには最終状態である Pg が 540 nm に新吸収帯をもたらす．この間 650 nm の Pr 型の基底状態の吸収帯は消えたままで，最終的に Pr が光照射で a，b に極大を示すような中間状態を経て Pg 型に遷移したことがわかる．更に多くの時間分解スペクトルを測定し，各中間体個々のスペクトルをガウス曲線を使ったシミュレーションと時間変化を計算した．

## 文献


1) B. Ke, *Photosynthesis, Photobiochemistry and Photobiophysics*, Kluwer. Dordrecht. 2001.
2) D. R. Ort and F. Yocum eds., *Oxygenic photosynthesis: The light reactions* Kluwer. Dordrecht. 1996.
3) S. Itoh, M. Iwaki & I. Ikegami, *Biochim. Biophys. Acta* **1507** (2001) P.115.
4) H. T. Witt, Biochim. Biophys. Acta **505** (1979) P.355.
5) A. Trebst and M., Avron, eds. *Encycllopeia of Plant Physiology. Photosynthesis I*, Springer-Verlag, Berlin. 1977.
6) A. San Pietro, ed. *Methods in Enzymology"*, **69**, Academic Press, New York. 1980.
7) T. Hiyama, and B. Ke, Biochim. Biophys. Acta **267** (1972) P.160.
8) K. Sauer, P., Mathis, S, Acker and J. van Best, *Biochim. Biophys. Acta*, **503** (1978) P.120.
9) S. Katoh, S. Shiratori and A. Takamiya, *J. Biochem*. **51** (1962) P.32.
10) G. Döring, G. Renger, J. Vater and H. T. Witt, Z. Naturforsch. **24b** (1969) P.1139
11) W. Junge and H. T. Witt, *Proc. Natl. Acad. Scie., USA* **63** (1968) P.963.
12) W. Haehnel, *Biochim. Biophys. Acta* **459** (1977) P.418–419.
13) S. Kumazaki, M. Iwaki, I. Ikegami. H. Kandori, K. Yoshihara and S. Itoh, *J. Phys. Che*m,. **98** (1994) P.11220.
14) S. Itoh, H. Mino, K. Itoh, T. Shigenaga, T. Uzumaki and M. Iwaki, *Biochemistry* **46** (2007) P.1247.
15) R. Narikawa, Y. Fukushima, T. Ishizuka, S. Itoh and M. Ikeuchi, *J. Mol. Biol*., **380** (2008) P.844.

# 2．分光測定法
## d．EPR 法

三野　広幸[1)]

本稿では，はじめに EPR 法の原理を紹介し，次に，X-band 汎用 EPR 機による測定法の使用を想定し，光合成研究への応用例を紹介している．また，最近のより進んだ EPR 測定法についても簡単に紹介している．

## EPR spectroscopy for photosynthesis research

Hiroyuki Mino

EPR (Electron paramagnetic resonance) is a powerful method for photosynthetic research.　In this chapter, we introduce the principle of the EPR technique and some methods for spin quantization in photosynthetic organisms.　Some examples of EPR signals in photosynthetic organisms and recent techniques are introduced.

EPR 法は光合成研究で定量から分子構造の解明まで広く使用される．近年ではパルス法，多周波 EPR 法などの新手法も発展している．EPR 装置といえば一般的には X-band（9 GHz）帯の連続波（CW）-EPR 機で，共通機器として広く大学や研究所に装備されている．いくつかの点に注意すれば汎用の分光測定器と同様に簡便に用いることができて，研究の幅をより一層広げられる．本章では，汎用機を使用した測定例を中心に EPR 法を紹介する．

### 2.d.1　EPR 法の原理[1−3)]

EPR（電子常磁性共鳴）は電子スピンを対象とした磁気共鳴法である．ESR（電子スピン共鳴）とはほぼ同義に用いられる．主な検出対象はラジカル，遷移金属である．核スピンを対象とする NMR（核磁気共鳴）に比べると感度は格段に高いが，光学的分光法に比べるとかなりの高濃度試料が必要で，ラジカル濃度にして 20 $\mu$M 以上の濃度が必要である．測定は非破壊的に行うことができ，測定そのものによる損傷はない．精製純度の低いタンパク質などでも目的信号のみを検出できる利点はあるが，それは検出対象が限られるということでもある．

EPR の原理を理解するには基本的に以下の 3 種類のエネルギー分類を知っておけばよい．

1．電子スピンのゼーマンエネルギー：磁場中で電子スピンの向く方向によって生じるエネルギー差である．（電子スピンを小さな磁石と考えれば理解しやすい．）エネルギー差は磁場の大きさに比例し，その比例定数を $g$ 因子と呼ぶ．$g$ 因子は有機ラジカルの場合にはほぼ 2 の値である．$g$ 因子は分子の形や方向によって異なるため，これを利用して分子構造を知ることができる（図 1）．

2．核スピンのゼーマンエネルギー：磁場中で核スピンがどちらの方向を向くかによって生じるエネルギー差である．（核スピンを小さな磁石と考えれば理解しやすい．）電子のゼーマンエネルギー同様，エネルギー差は磁場の大きさに比例し，その比例定数を核の $g$ 因子（$g_n$）と呼ぶ．核の $g$ 因子は核の種類により異なる．このエネルギー遷移を NMR 遷移と呼ぶ．

3．超微細相互作用：電子スピンと核スピンの相互作用である．これは電子磁石と核磁石の磁石間の相互作用と考えればよい．

以上の 1 から 3 によって磁場中で電子スピンのエネルギー準位がわかれ，分裂したエネルギー幅に等しいエネ

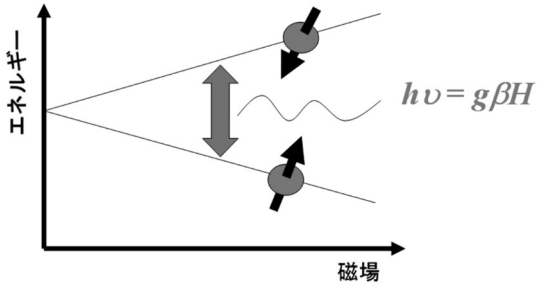



**図 1**：磁場中におかれた電子スピンはスピンの向きによってエネルギーに差を生じる．これをゼーマン分裂と呼ぶ．エネルギー差は磁場の強さと $g$ 因子で決まる．エネルギー差に対応したマイクロ波をあてると共鳴吸収がおこる．

1）名古屋大学理学研究科（物質理学）

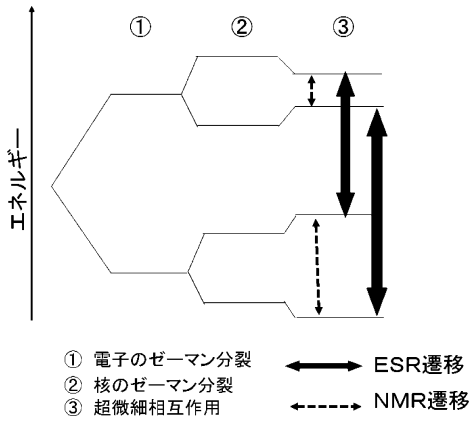



図 2：1 つの電子スピンと 1 つの核スピンが磁場中におかれた場合のエネルギー準位の模式図．ESR 遷移と NMR 遷移は同時にはおきない．①電子のゼーマン分裂，②核のゼーマン分裂，③超微細相互作用．

ルギーのマイクロ波を加えることにより共鳴吸収がおきる（図 2）．EPR 遷移と NMR 遷移は同時にはおきないため，図 2 の場合には 4 準位のうちで 2 種類の EPR 遷移が観測される．信号強度はエネルギー準位間のスピン数の差によって決まる．準位を占める状態の数の差が大きければそれだけ大きな信号が得られる．各準位にいるスピン数はボルツマン分布により決まるため温度が下がれば下の順位にいる数が増え，それだけ大きな信号が得られる（キューリーの法則）．原理的には 0 °C（273 K）と液体窒素温度（77 K）では信号強度は 3.5 倍に，液体ヘリウム温度（4.2 K）では 65 倍になる．このため，定量的な議論をする場合には信号強度への温度の影響を考慮しなければならない．

## 2.d.2　装置の概要[4)]

一般的な 9 GHz 帯の EPR 装置の場合次のような構成をしている．（図 3）

1．外部磁場印加用のマグネット
2．マイクロ波の発振器および信号検出器（マイクロ波ブリッジ）
3．空洞共振器

EPR の測定では試料を空洞共振器に挿入し測定を行う．空洞共振器は信号感度を決める最も重要な部分といってもよい．空洞共振器には内部の形状により矩形型，円筒型などの違いがあり，感度，測定条件などがそれぞれ異なる．また，内部のマイクロ波の定在波のモードによって TM 型，TE 型などがある．汎用には矩形型または円筒型の TE 型空洞共振器が使用されることが多い．TM 型空洞共振器は水による誘電損失

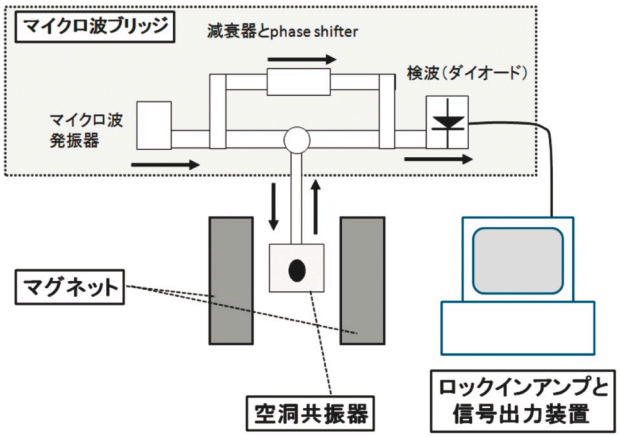



図 3：EPR 測定装置のブロックダイアグラム

が少ないため溶液系の測定に有利である．どのような空洞共振器を用いているのかは測定前に確認しておいたほうがよい（図 4）．通常の EPR 測定では変調磁場を用いるが多くの場合，変調コイルは空洞共振器内に装着されている．

4．信号検波装置と出力装置（コンピューター，レコーダーなど）

信号の検波は通常ロックインアンプを用いて変調磁場に同調させて行う．このため EPR スペクトルは微分形で測定される．

## 2.d.3　測定法の一般的注意[1−5)]

測定は以下の手順に従う，

1．マイクロ波の強度を決定する．
2．変調磁場の大きさを決定する
3．外部磁場の掃引範囲を決める．

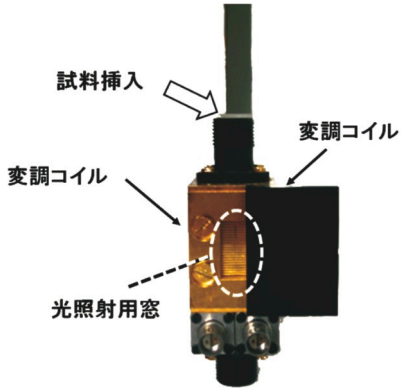



図 4：Bruker 社製空洞共振器　矩形型 $TE_{102}$．正面のカバーをずらしたところ
試料管は共振器上部から挿入する．共振器の正面から光を照射できる．両側には測定用の補助コイルが組み込まれており，変調磁場を加えることができる．

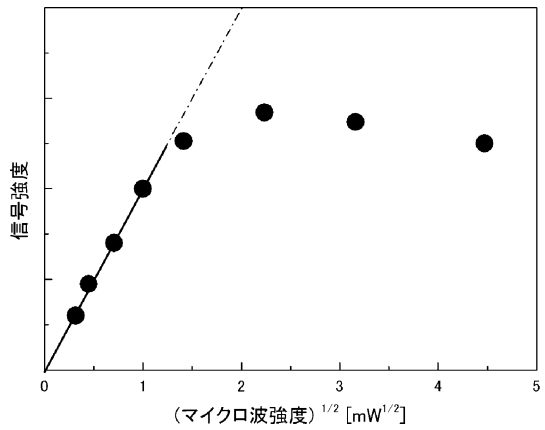



図5：マイクロ波強度とEPR信号の強度の関係
飽和していない条件ではEPR信号強度はマイクロ波パワーの平方根に比例する．正しい線形のスペクトルを測定するには比例関係のなりたつ範囲で測定を行う．飽和の条件は試料や空洞共振器の種類によって異なる．

4．外部磁場の掃引時間と信号検出時の時定数を決める．(詳細は各装置の取り扱い説明書を参照されたい．)

以下にそれぞれの注意すべき点を挙げる．

1．マイクロ波の強度

適正な条件ではEPR信号強度はマイクロ波のパワーの1/2乗に比例して大きくなる．よって強いマイクロ波の方が観測には有利である．しかし，マイクロ波が強すぎるとこの比例関係がなりたたずスペクトルのひずみを招く．このため初めて観測する信号の場合，マイクロ波パワーを変えて信号強度をグラフにプロットしておく必要がある（図5）．得られたグラフから比例関係の成り立つ範囲を読み取り適正なマイクロ波強度で観測する．マイクロ波のパワーが強くなると信号強度は飽和し，比例関係が成り立たなくなる．飽和特性は温度にも依存するので注意が必要である．低温ほど飽和しやすい．なお，特別な使い方としてグラフの飽和特性からラジカル間の距離などを読み取ることもできる．

2．変調の大きさ

標準的なEPRの測定の場合信号検出用に外部から100 kHz程度の変調磁場を与える．

信号強度は変調磁場に比例して大きくなる．しかし変調磁場が大きくなるとスペクトルのひずみを招く（図6）．このため初めて観測する信号の場合．変調磁場の大きさを変えてスペクトルの形が変わらないことを確認しておく必要がある．適正な変調磁場の大きさは観測したいEPRスペクトル中のピーク分離幅の1/3〜1/4が目安である．

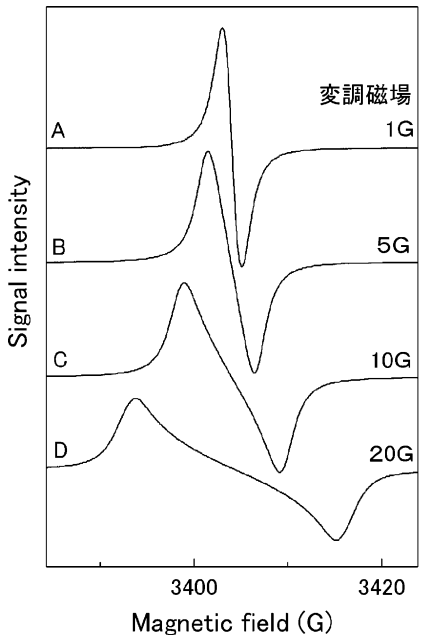



図6：変調磁場の効果
変調磁場を変えて測定したDPPHのEPR信号．変調磁場を大きくすると信号強度は強くなるが，大きすぎると信号線形がひずみ本来の線形が崩れる．

3．外部磁場の掃引

有機ラジカルの場合外部磁場の掃引幅は50〜200 Gでよい．通常$g=2$周辺に観測される．中心磁場の位置は以下の式が目安になる．

[中心磁場(G)]=[マイクロ波周波数(GHz)]×357

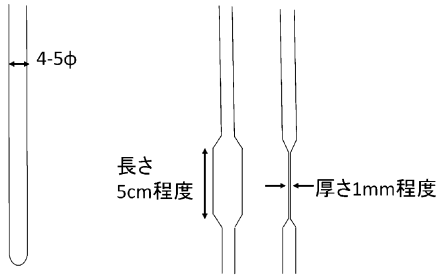
4．掃引速度と時定数

EPR測定では外部磁場を掃引することにより信号を得る．掃引速度が速いとスペクトルがひずむことがある．初めて信号を観測する対象の場合，掃引速度を変えて測定し，スペクトルが掃引速度によって変わらないことを確認しておく必要がある．

## 2.d.4　測定温度による測定法の違い

### 室温測定

通常EPR測定では外径4 mm内径3 mm，あるいは外径5 mm内径4 mmの専用の石英試料管を用いる．しかし，室温での測定の場合には誘電損失のため多量に水分を含む試料は測定できない．このため測定には平型試料管を用いる（図7）．平型試料管中の試料体積は数$\mu$lである．測定を簡便に行うなら，ガラス製毛細管を用いてもよい．ガラス製毛細管の場合廉価で手軽に測定ができるが，ガラスに不純物が含まれるためバックグランド信号がでることに注意が必要である．ガラス製毛細管の場合




(A) 石英試料管　　(B) 平型試料管

図 7：EPR 試料管の形状．(A) 通常のもの．(B) 溶液測定用の平型試料管の形状．

50 μl（外径 1.5 mm 程度）のものが使いやすい．100 μl の毛細管でも測定は可能であるが，水分量が増えることにより信号の感度が落ちる場合がある．また空洞共振器の中の感度の実効長は 1 cm 程度であるが，スピン定量を行う場合には余裕をみて 2 cm 長程度いれておき共振器の中心位置に据える．

**凍結状態での測定**

試料は外径 4 mm 内径 3 mm，あるいは外径 5 mm 内径 4 mm の専用の石英試料管にいれる．

試料体積は 150 μl 程度，濃度は 20 μM 以上が目安である．

**液体窒素温度（77 K）での測定：**

液体窒素測定には専用のデュワーが市販されている（図 8）．液体窒素を継ぎ足すことなく 1 時間程度の観測ができるが，使用頻度により 3 か月から 1 年で真空度が低下するので定期的に真空を引きなおす必要がある．液体窒素の沸騰による試料管の振動を避けるため，デュワーの底にグリセロールを 1 滴たらしておくと沸石がわりになる．あるいは，液体窒素をいれた状態でデュワー内を減圧することにより沸騰はおさまる．

**極低温から室温での測定：**

低温での測定のために Oxford 社などから，専用の測定ユニットが市販されている．1.5-300 K での測定が可能である．77 K から室温までの制御ユニットは各 EPR メーカーで市販されている．77 K 以下の極低温の場合には専用ユニットを使う必要がある．それより高温は，ヒーターなどで液体窒素容器から発生させた低温の窒素ガスを石英製二重管中の試料に吹き付ける簡便な方法で得られる．

**酸素分子の影響：**

酸素分子は常磁性種であるためバックグランド信号となる．特に極低温の場合，固体酸素となり試料管下部に蓄積するため，より影響が大きい．真空ポンプで試料管を引いた状態でバーナーによって封じるのが最もよい方法であるが，測定前に試料管中の空気を窒素やアルゴンガスによって置換して封じてもよい．あるいはゴムのキャップを用いて封じてもよい．バーナーで試料管を封じた場合には，ひび割れなどで試料管中に液体窒素がたまりこみ，室温にあげた際に爆発することがあるので注意が必要である．

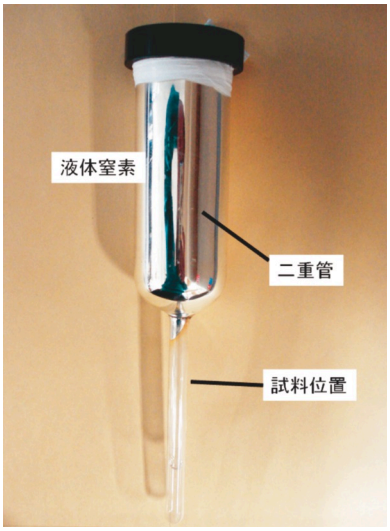



図 8：液体窒素温度での EPR 測定専用デュアー．空洞共振器に挿入して使用する．

## 2.d.5　EPR 法を用いた分子数の定量法

スピン $S=1/2$ をもつ分子の EPR 信号は同じスピン数なら信号の線形によらず積分強度は一定となる．通常の有機ラジカルはスピン $S=1/2$ である．これを利用してタンパク量を定量できる．（EPR で観測される信号はスピン $S=1/2$ だけではない点に注意が必要である．たとえば三重項の場合スピン $S=1$，$Mn^{2+}$ の場合スピン $S=5/2$ である．）

**光化学系 II のスピン定量**[6,7]

**[実験方法]**

光化学系 II のチロシン D˙ は安定なラジカル状態で存在する．このためチロシン D˙ を定量することによって光化学系 II の反応中心数を定量することができる（図 9）．

定量にはチラコイド膜または，精製した光化学系 II 粒子を用いる．細胞のままでも不純物からのラジカル信号がなければ計測は可能である．ここでは精製した BBY 粒子からの場合を例に示す．測定は凍結状態下で行う．

1．標準試料を用意する．スピンラベル試薬である TEMPO を水に溶かし適当な濃度に調整しておく．ス

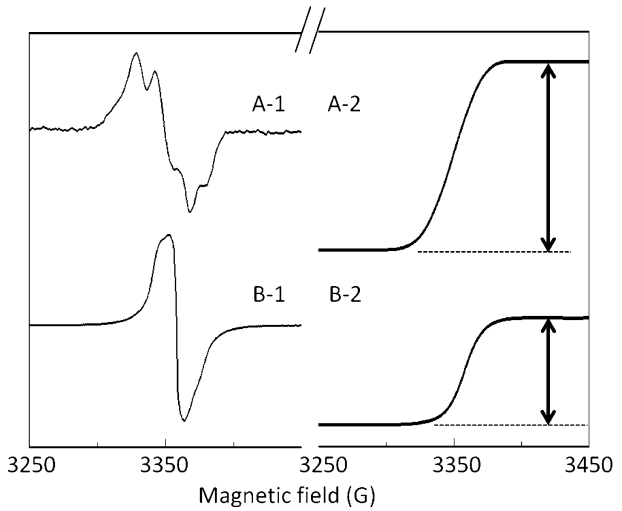



**図9**：(A-1) 光化学系II由来のチロシン D· ラジカルの EPR 信号 (B-1) TEMPO 水溶液の EPR 信号．測定は凍結状態で行った．定量のためには比較試料も同じ測定条件で測定するのが望ましい．(A-2，B-2)チロシン D· ラジカル，TEMPO ラジカルの EPR 信号をそれぞれ二重積分したもの．二重積分の強度比からスピン量を定量する．

ピンラベル試薬は劣化する場合があるので注意して保存しておく．

2．BBY 粒子を 4-6 mgChl/ml の濃度に調整し，クロロフィル濃度を定量しておく．

3．試料を EPR 試料管に移す．試料長は 1 cm 以下(100 $\mu$l 程度）にしておく

4．0 ℃で試料に 10 秒～ 1 分間光照射を行う．

この操作により還元されていたチロシンDも酸化され，すべてのチロシンDが酸化型になる．

5．光照射後数秒程度おいてから暗状態で液体窒素中に移し凍結する．

6．77-100 K 程度の温度でチロシン D· の信号を測定する．

測定条件の目安は，マイクロ波強度：0.05 mW　変調磁場 4 G　磁場掃引幅 200 G　掃引時間 30 秒

7．得られたスペクトルを二重積分し，積分強度を得る．積分操作のためにはベースラインをあらかじめ引いておく必要がある．

ベースラインはチロシン D· 信号の存在していない両端の位置から 1 次，あるいは 2，3 次程度でのフィッティングを行う．1 回目の積分後にもベースラインはひずむため，再度ベースラインを引き算してから積分する．

8．TEMPO ラジカルを標準試料として全く同じ条件で測定する．

9．TEMP ラジカルで得られたスペクトルを二重積分し，積分強度を得る．

10．チロシン D· と TEMPO ラジカルで得られた積分値を比較しその比からチロシン D· のスピン量を求める．(図 9)

この方法によりクロロフィル定量から求められたクロロフィルの分子量とチロシン D· との比は 210-230 になる．

注意：EPR の測定条件が異なる信号の積分値を比較するには変調，マイクロ波強度，横軸のデーターポイント数，温度，磁場掃引幅を考慮する必要がある．特にデーターポイントが異なる場合二重積分後の値はデーターポイント比の二乗に比例することに注意が必要である．煩雑な計算を避けるため，標準試料はすべて同じ条件で測定するのが望ましい．

### 光化学系 I の定量[6,7]

光化学系 I の量は反応中心クロロフィル P 700$^+$ を定量することによって得られる．

測定法は光化学系IIのチロシン D· に準ずる．

P 700$^+$ は光化学系 I 粒子に 10 mM のフェリシアン化カリウムを加えることにより得るか，低温下で光照射することにより得る．反応中心すべてに十分光照射されていることに注意が必要である．光合成バクテリアの反応中心の定量もこれに準ずる．

### PSI/PSII 比の算出[7]

チロシン D· と P 700$^+$ のラジカル量比から PSI/PSII 比を求めることができる．PSI/PSII 比のみの算出の場合，TEMPO などの標準試料は必要としない．(図 10)

1．チロシン D· 信号を測定する．(光化学系IIの測定法参照)

2．同じ試料を低温下で（200 K 以上で）十分光照射し P 700$^+$ をつくる．

フェリシアナイドを 10 mM になるように加えてもよい．

200 K 以下で光照射すると，光化学系 II 由来の Chlz$^+$ が同時に酸化蓄積されるので，注意する．

3．P 700$^+$ とチロシン D· の重なった信号から予め測定しておいたチロシン D· の信号を引き算し P 700$^+$ のみの信号を得る．

4．チロシン D·，P 700$^+$ それぞれの信号を二重積分し得られた値から PSI/PSII 比を得る．

### $Mn^{2+}$ イオンの含有量の定量[8]

植物の葉を直接 EPR で測定した場合 $Mn^{2+}$ の信号が観測されることがある．これは液胞に含まれている $Mn^{2+}$ と考えられる．酸素発生系マンガンクラスター由

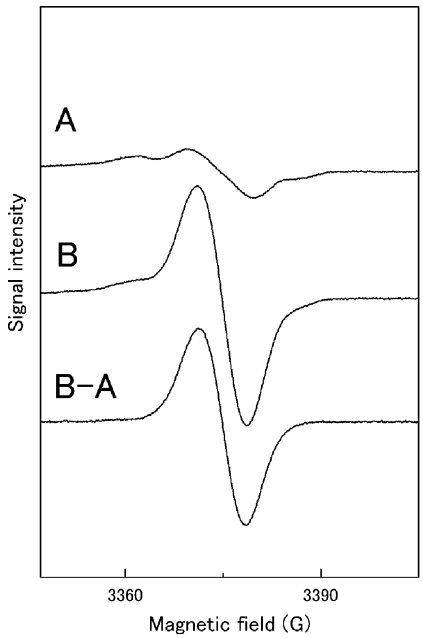



図 10：クロロプラスト標品での測定例．A：光化学系 II 由来のチロシン $D^{\cdot}$ の信号．B：200 K 光照射下での信号．B-A：引き算により得られた $P700^{+}$ の信号．測定は凍結状態で行った．

来のマンガンの EPR 信号は室温では観測されない．しかし酸素発生系を酸により破壊すると酸素発生系のマンガンは $Mn^{2+}$ イオンとして溶出する．これを利用して $Mn^{2+}$ 量（光化学系 II の量）を求めることができる．以下はチラコイドまたは BBY タイプ PSII 標品での測定例である．（図 11）

1．試料を 1 ml のチューブに移し体積の 1/10 量の硝酸を加える．この操作により光化学系 II に含有されるマンガンクラスターが壊れ $Mn^{2+}$ となり溶液中に溶出する．

2．18,000×g 5 分程度で遠心分離する．

3．上澄みを 25 $\mu$l の毛細管中に吸引し，真空グリースなどで毛細管の両端をふさぐ．
サンプル量は十分長くとる（2〜3 cm）．

4．EPR 測定用試料管中（内径 3 mm 外径 4 mm，あるいは内径 4 mm 外径 5 mm のもの）この毛細管をいれ，空洞共振器の中央におき測定を行う．
EPR の測定条件例：室温，変調 20 G，マイクロ波パワー 1 mW，磁場掃引幅 1000 G．$Mn^{2+}$ 由来の 6 本の EPR 信号線が観測できる．

5．濃度既知の $MnCl_2$ 水溶液を同じ 25 $\mu$l 毛細管に同量とる．

6．試料と同じ条件で $MnCl_2$ 水溶液を測定する．

7．試料中の $Mn^{2+}$ の信号強度と $MnCl_2$ 水溶液中の $Mn^{2+}$ の信号強度を比較する．

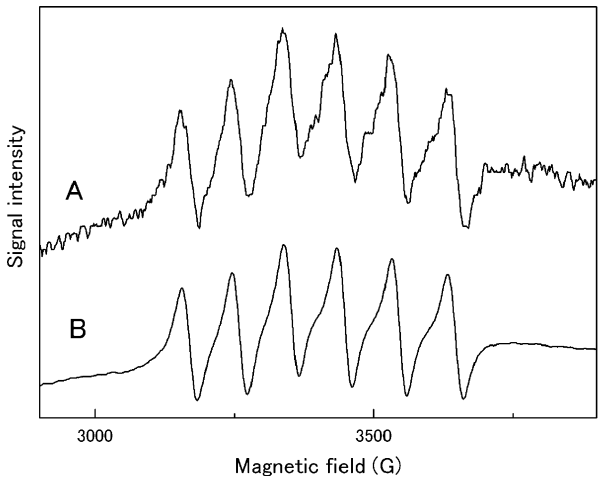



図 11：(A)：クロロプラストから抽出した $Mn^{2+}$ イオンの EPR 信号（B)：$MnCl_2$ 水溶液中の $Mn^{2+}$ イオンの EPR 信号．強度比から $Mn^{2+}$ を定量する．

8．信号強度比から $Mn^{2+}$ のスピン量を求める．
活性な酸素発生系を光化学系 II あたり 4 個の $Mn^{2+}$ が析出する．
（注：必ずしも遠心分離の必要はないが，これを行わない場合測定中に固体成分が毛細管の下部へ沈降し，感度や周波数などの測定条件が変わる場合がある）

### *in vivo* での葉の EPR 測定

植物の葉を直接測定する場合，葉を適当な大きさに切断して石英 EPR 試料管に挿入すればよい．多くの場合 $Mn^{2+}$ や由来不明のフリーラジカルが観測されるが，若い葉や植物種によっては $Mn^{2+}$ が観測されずチロシン $D^{\cdot}$ のみ信号が観測できる場合がある．また，空洞共振器内への光照射によって $P700^{+}$ を観測することもできる．シアノバクテリアの場合，細胞のままでは不純物由来の EPR 信号が大きく大抵の場合観測は困難であるが，条件や種によっては不純物ラジカル由来の EPR 信号が全くでない試料もある．

## 2.d.6 EPR 法による光合成反応中心の信号

### マンガンクラスターの EPR 信号[9−14]

酸素発生系由来の EPR 信号は極低温でのみ測定できる．これまでに $S_0$，$S_1$，$S_2$，$S_3$ 状態の EPR 信号が観測されているが，通常観測できるのは $S_0$，$S_2$ 状態のみである（図 12）．特に $S_2$ 状態に由来する $S_2$ マルチライン信号は，その発見以来 EPR 法における酸素発生系の構造研究や，S 状態のモニターに使われてきた．$S_2$ 状態は 200 K での光照射で生成される．通常 $g=2$ を中心に 80-90 G

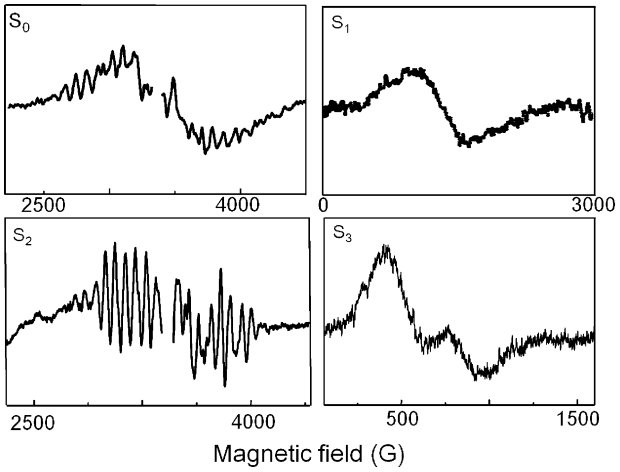



**図 12**：酸素発生系マンガンクラスターの信号
$S_2$ 信号が最も広く研究には用いられている．$S_1$，$S_3$ 信号は bimodal 空洞共振器によって測定．

間隔で 18–20 本からなる EPR 信号が観測される．この $S_2$ マルチライン信号と同時に $g=4$ 付近にも $S_2$ 状態由来の信号が観測される．アルコール類の添加で $g=4$ 信号は消失する．140 K での光照射で大きな $g=4$ 信号が観測されるが，200 K に温度を上げてアニールすると $S_2$ マルチライン信号と強度を交換して $g=4$ 信号は小さくなる．$S_2$ マルチライン信号は $Ca^{2+}$ 除去や $NH_4$ イオンの添加により線の本数が増える．$Cl^-$ イオンを除去すると $S_2$ マルチラインは観測されず $g=4$ 信号のみが観測される．

BBY タイプの光化学系 II での観測では，試料濃度は 10 mgChl/ml（タンパク質濃度で 50 $\mu$M 程度），変調は 20 G，マイクロ波強度は 0.2 mW が目安となる．10 K 以上では観測できない．

### $FeQ_A^-$ 信号

光化学系 II の電子受容体 $Q_A^-$ は，近傍の非ヘム鉄との相互作用により幅の広い信号として観測される．また，この信号は鉄との相互作用のために有機ラジカルに比べて飽和しにくい（図 5）．そのため強いマイクロ波パワー（100 mW 程度）にして他の磁性種の EPR 信号を飽和させる条件下で測定すると観測しやすい．Fe を Zn などに置換すると $Q_A^-$ のみの一般的な有機ラジカル信号を観測できる．紅色バクテリアでも同様である．

### クロロフィル信号[6)]

クロロフィル由来の信号としては，光化学系 II の反応中心 $P680^+$，$Chl_Z^+$ 光化学系 I の反応中心 $P700^+$，バクテリアの反応中心 $P840^+$ などがある．$P680^+$ 以外は 10 mM 程度のフェリシアナイド添加，あるいは凍結状態での光照射により安定なラジカルとして観測できる．正しい信号線形を得るためには小さな変調磁場（2–3 G）での測定を行う．$P680^+$ はすぐに還元されてしまうので時間分解 EPR 法によってのみ観測できる．

### トリプレット信号の測定[15)]

電子受容体が還元された状態の光合成反応中心を光照射すると，反応中心クロロフィルのトリプレットが形成され，EPR で観測できる．II 型反応中心では電子受容体キノンの二重還元，あるいは除去によって観測できる．光化学系 II 反応中心タンパク質を 4.2 K で連続光照射して出来た $^3P680$ の EPR 信号を図 13（A）に示す．

## 2.d.7 時間分解 EPR

磁場を固定して EPR 信号強度の時間変化を測定すればラジカル信号の生成消滅をモニターできる．レーザー光照射と同期して測定をはじめればよい．ただし，時間分解能は変調磁場の周波数で制限される．（100 kHz 変調では 10 $\mu$s 程度より早い時間変化は測れない）．より高速での時間分解測定では，変調磁場をかけずデジタルオ

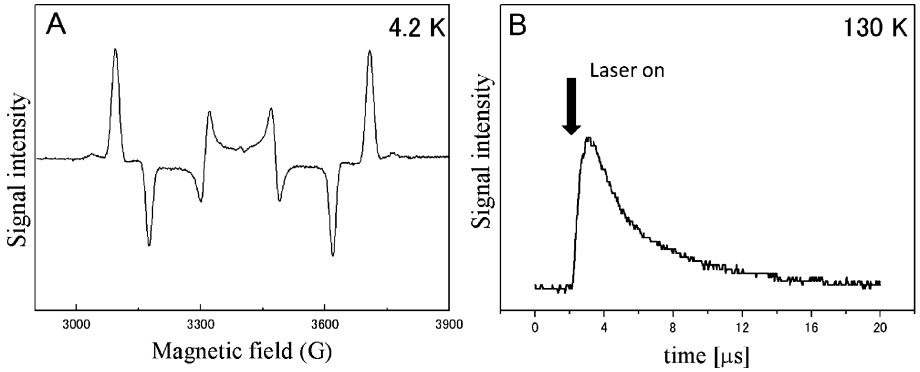



**図 13**：$^3P680$ の EPR スペクトル（左）4.2 K 定常光照射下での磁場掃引スペクトル（右）130 K でのレーザー同期による $^3P680$ の時間分解 EPR スペクトル．右の場合変調磁場は用いていない．

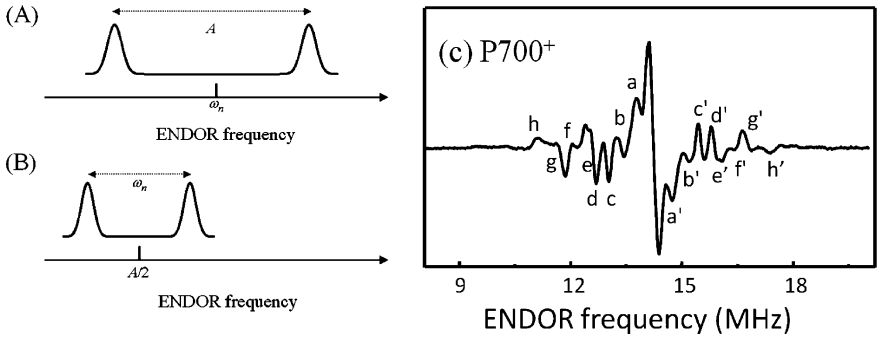



**図 14**：(A，B) ENDOR の信号パターン（A）核ゼーマン $\omega_n$ が超微細相互作用 A の 1/2 より大きい場合（B）核ゼーマン $\omega_n$ が超微細相互作用 A の 1/2 より小さい場合（C）光化学系 I 反応中心クロロフィル P 700+ の ENDOR 信号．信号パターン（A）に対応して，左右対称な信号となる．

シロスコープなどに直接信号を出す．この場合，信号は微分形ではなく積分形(吸収形)で検出される．図 13(B)に$^3$P 680 の時間分解 EPR を示す．

## 2.d.8 パルス EPR 法による光合成反応中心の信号測定

パルス EPR 法や多周波 EPR 法が光合成反応中心タンパク質の研究では盛んにすすめられている．これらの手法は分子構造の解析や，ラジカル間の距離測定に威力を発揮する．ここでは ENDOR, ESEEM, 多周波数 EPR について簡単に紹介しておく．

### ENDOR 法と ESEEM 法

ENDOR（電子核二重共鳴）法はマイクロ波による EPR 遷移とラジオ波による NMR 遷移を同時におこすことによって超微細相互作用（図 2）を検出する方法である．EPR の強度で NMR の分解能を実現することができ，分子上の電子スピン密度，プロトン位置などについての情報が得られる．ENDOR の信号パターンには次の 2 通りがある．

(A) 核ゼーマン相互作用が超微細相互作用の 1/2 より小さな場合(図 14(A))．有機ラジカルにおいてプロトンの信号を ENDOR で観測する場合（A）のパターンになる．図 14(C) は光化学系 I の反応中心クロロフィル P 700+ のプロトン ENDOR 信号である．プロトンの共鳴周波数（14-15 MHz）を中心に左右対称な 1 対の信号となる．分離幅の大きさが超微細相互作用の大きさになる．これに対して (B) 核ゼーマン相互作用が超微細相互作用の 1/2 よりより大きな場合には図 14(B)のようなパターンになる．超微細相互作用の 1/2 の周波数を中心に核ゼーマン相互作用の大きさで一対の信号が観測できる．マンガン核のように核のゼーマン相互作用が小さな核に対する ENDOR 信号はこのパターンになる．

ENDOR 法は観測条件が厳しく，信号を観測できるかどうかは実際に測定してみないと予想できないという難点が普及を妨げてきた．しかし，最新のパルス ENDOR 法を使えばスピンエコー信号が検出されれば原理的には観測可能で，状況は大きく改善されている．

ESEEM（電子スピンエコー変調）法はパルス ESR 法の手法の一つである．図 15(A)に 2 パルスでの ESEEM の例を示す．時間間隔 $\tau$ でマイクロ波パルスを磁場中でかけると $\tau$ 時間後にスピンエコー信号が観測される．時間間隔 $\tau$ を変化させると超微細相互作用によってスピンエコー信号の強度が変調を受ける．図 15(B)に光化学系 I 反応中心 P 700+ の 2 パルス ESEEM 信号を示す．

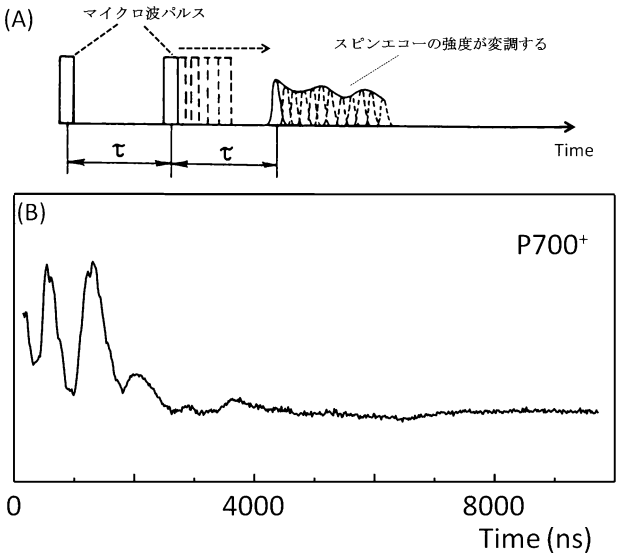



**図 15**：(A) 2 パルス ESEEM の測定法．2 つのマイクロ波パルスを時間間隔 $\tau$ でかけると，$\tau$ 時間後にスピンエコー信号が観測される．$\tau$ を変えると，超微細相互作用に由来する変調効果がスピンエコー強度に現れる．(B)2 パルス法により測定した P 700+ の ESEEM スペクトル．図中の振動パターンはクロロフィルの Mg に配位している窒素核の NMR に由来する．解析の際には時間変化スペクトルをフーリエ変換する．

変調は主にクロロフィルのマグネシウムに配位している窒素核に由来している．時間変化のスペクトルはフーリエ変換によって周波数軸になおして解析を行う．ENDORがプロトンなど$g_n$因子が比較的大きな核の測定に有利なのに対して，ESEEMは窒素核，重水素など$g_n$因子が比較的小さな核に対して有効である．

**多周波数EPR**

一般にEPRの測定には9 GHz帯が使われる．しかし，周波数を変えてEPRを測定することにより多くの情報を得ることができる．ゼーマンエネルギーは磁場の大きさに比例して大きくなるため（図1，2）高周波のESRでは$g$因子の異方性，つまり分子構造の方向による違いにより信号を分解することができる．逆に，低周波のESRでは$g$因子の異方性が小さくなるが，相対的に超微細相互作用（図2）が大きくなるため電子と核との相互作用をみるのに適している．図16に多周波数ESR法によるチロシン$D^{\cdot}$の信号を示す．周波数の低いS-bandでは$g$因子の異方性の影響が小さくなり中心から左右対称なスペクトルが得られている．一方周波数の高いW-bandでは$g$因子の異方性によりスペクトルが分裂している．これらの手法により分子構造の詳細を知ることができる．

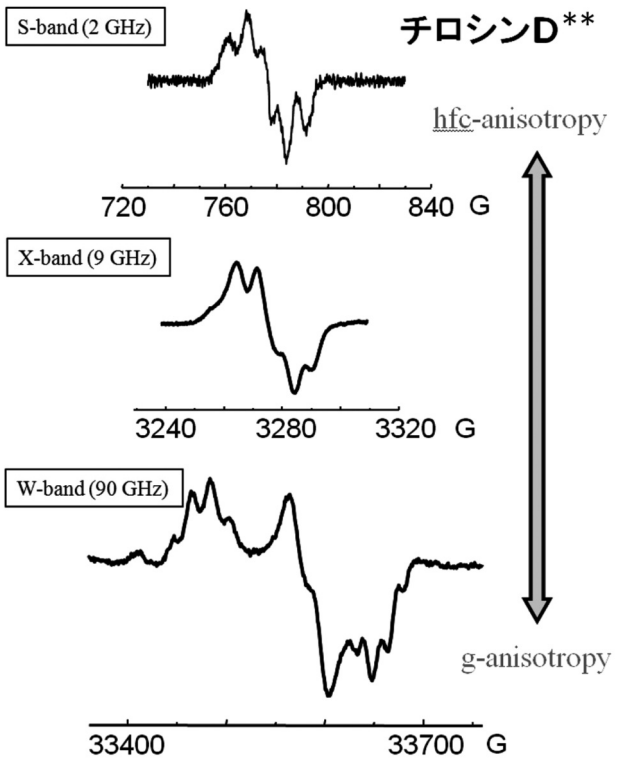



図16：

## 2.d.9 おわりに

本稿では主に汎用の共通機器として測定可能と思われる方法を中心に例をあげた．本稿ではふれなかったが，他にもスピンラベル法，スピントラップ法なども盛んに使用されている．これらの測定に関しての注意点は本稿で紹介したものに準じて頂きたい．本稿の最後にはより進んだ測定法の例をいくつかあげた．特に，パルスEPR法，時間分解EPRは幅広く研究がおこなわれており，光合成系は最も成功しているEPRの応用対象のひとつとして数えられている．興味をもたれた方は参考文献[16–18]を一読されたい．

## 参考文献


1）C. P. スリクター「磁気共鳴の原理」，シュプリンガー・フェアラーク東京，1998．
2）A. Carrington & A. D. Mclachlan「化学者のための磁気共鳴」培風館，1970．
3）桑田敬治，伊藤公一「電子スピン共鳴入門」南江堂，1980
4）アルガー「電子スピン共鳴」吉岡書店，1968．
5）大矢博昭，山内淳「電子スピン共鳴」講談社，1989．
6）A. F. Miller & G. W. Brudvig Biochim. Biophys. Acta (1991), P.1056.
7）S. Itoh, H. Mino, K. Itoh, T. Shigenaga, T. Uzumaki & M. Iwaki, Biochemstry (2007), **46**, P.12473
8）T. Ono & H. Mino Biochemistry (1999), **38**, P.8778
9）河盛阿佐子，「電子と生命」，共立，2000，P.70
10）J. Messinger, J. H. A. Nugent & M. C. W. Evans Biochemistry (1997), **37**, P.11055
11）T. Yamauchi, H. Mino, T. Matsukawa, A. Kawamori & T. Ono (1997) **36**, P.7520
12）G. C. Dismules & Y. Siderer Proc. Natl. Acad. Sci. (1981), **78**, P.274
13）T. Matsukawa, H. Mino, D. Yoneda & A. Kawamori (1999), **38**, P.4072
14）V. K. Yachandra, K. Sauer, and M. P. Klein, Chem Rev **96** (1996) P.2927.
15）F. J. E. Vanmieghem, K. Satoh & A. W. Rutherford, Biochim. Biophys. Acta (1991), **1058**, P.379.
16）H. Kurreck, B. Kirste & W. Lubitz, Electron Nuclear Double resonance spectroscopy of radicals in solution, 1988, VCH.
17）A. Schweiger & G. Jeschke, Principles of pulsed electron paramagnetic resonance (2001) Oxford.
18）J. Ametz & A. J. Hoff, eds., Biophysical techniques in photosynthesis, 1996, Chaper 14–18, Kluwer.

# 2．分光測定法
## e．光誘起フーリエ変換赤外差スペクトル法

野口　　巧[1)]

光誘起フーリエ変換赤外（FTIR）差スペクトル法を用いることにより，光合成蛋白質における電子伝達成分などのコファクター及びその結合部位の構造や反応を原子・分子レベルで調べることができる．本手法の原理，及び測定・解析法について解説する．

## Fourier transform infrared difference spectroscopy

Takumi Noguchi

Light-induced Fourier transform infrared difference spectroscopy provides information on the structures and reactions of cofactors such as redox components in photosynthetic proteins at the atomic and molecular level. In this article, the principle of this spectroscopy and the methods of measurements and spectral analysis are explained.

### 2.e.1　はじめに

近年，光化学系Ⅰや光化学系Ⅱを含め，多くの光合成蛋白質の三次元構造がX線結晶解析により解明され，蛋白質中における色素やアミノ酸残基の構造や位置関係が明らかとなってきた．しかし，各コファクターの電子・プロトン移動反応や励起移動反応のメカニズムを分子レベルで理解するためには，活性部位における水素結合構造やプロトン化構造など，通常のX線結晶解析の分解能を越える，より詳細な構造情報が必要となる．また，実際の光合成反応を解析するためには，生理条件下における反応を直接観測することのできる分光学的手法が必要不可欠である．光誘起フーリエ変換赤外（FTIR）差スペクトル法は，こうした要求に答え，光合成蛋白質におけるコファクター及びその結合部位の構造・相互作用，及び反応を原子・分子レベルで調べることのできる手法である．

### 2.e.2　光誘起フーリエ変換赤外差スペクトル法：原理

赤外分光法やラマン分光法などの振動分光法は，分子の基準振動を検出することにより，化学結合や相互作用の存在及び強度としての分子構造情報を与える手法である[1,2)]．これは，X線結晶解析が原子（電子密度）の位置によって分子構造を表すのに相対する手法であるといえる．後者が分解能（一般的には1-3Å）以下の構造の違いに鈍感であるのに対し，基準振動の振動数は，分子の極めて微小な構造変化や相互作用変化を鋭敏に反映する．また，振動分光法は，化学結合や水素結合の生成や切断，強度変化を直接的に表すため，反応プロセスの解析に適している．

赤外分光法では，一般的に，振動基底状態から第一振動励起状態への赤外線吸収による遷移を検出する．生体系への応用としては，蛋白質のポリペプチド骨格のアミドⅠバンド（C＝O伸縮振動：1700-1600 $cm^{-1}$）を用いた二次構造解析が広く行われてきた[3)]．一方，分散型赤外分光計からフーリエ変換赤外（FTIR）分光計への移行に伴い，蛋白質の全体構造だけではなく，蛋白質中の活性部位のより詳細な構造や反応の解析が可能になった．

FTIR法では，干渉計によって生じる干渉光を，駆動鏡の位置の関数（インターフェログラム）として測定し，それをフーリエ変換することにより，波数を横軸とした赤外光分布を計算する[4,5)]．従って，分散型分光計のように赤外光の波数スキャンは行わない．駆動鏡の位置はFTIR分光計に内蔵されたHe-Neレーザーの633 nmの発振線により正確に決められるため，得られた赤外スペクトルの波数精度は極めて高いという特徴がある．そのため，ある反応の前後で測定した2つのスペクトルの差スペクトルから，強い吸収バンド下の極めて微小なスペクトル変化を検出することが可能である．通常の測定条件下（数分間のデータ積算）において，$\Delta A$ で $10^{-5}$ オーダーのシグナルを検出することができ，光化学系Ⅱや光

1）筑波大学　大学院数理物質科学研究科　物性・分子工学専攻

化学系 I のような分子量の大きな蛋白質複合体においても，各アミノ酸及びコファクター中の化学結合や相互作用の変化を調べることができる．このように，反応による蛋白質等の構造変化を FTIR を用いて検出し，その構造及び反応の情報を得る手法が反応誘起 FTIR 差スペクトル法である[6–8]．

反応を誘起するためのトリガとして光を用いた場合には，光誘起 FTIR 差スペクトル法と呼ばれ，光によって反応を進めることができる光合成試料では主にこの手法が用いられる[9–14]．また，電位を変化させることによって，電子伝達成分の酸化還元反応由来の FTIR 差スペクトルを測定することも可能である[9,10]．本稿では，光合成分野においてより一般的な光誘起 FTIR 差スペクトルの測定法について述べる．電気化学反応誘起の場合でも，試料部以外の測定・解析法はほぼ同じである．

生体物質は基本的にすべて赤外活性であると考えてよい（酸素分子も金属に結合して対称性が崩れれば赤外活性となる）．よって，反応によってある分子または構造部分に何らかの変化が起これば，それらは必ず FTIR 差スペクトルに現れる．つまり，蛋白質骨格，各アミノ酸側鎖，基質，そして水分子など，系に含まれるあらゆる分子の構造変化を FTIR によって検出することができる．これは，励起光に共鳴する特定の色素の振動だけが検出される共鳴ラマン法と対照的である．コファクターの構造変化だけではなく，それに共役した蛋白質や水分子の反応を捉えることができるのは FTIR 差スペクトル法の大きな長所である．

## 2.e.3 測定法

### 2.e.3.1 測定系

図 1 に，光誘起 FTIR 差スペクトルの測定システムの一例を示す．通常の中赤外領域（4000–600 $cm^{-1}$）の測定には，高感度 MCT（HgCdTe）検出器を用いる．FTIR 分光計に標準的に装着されている TGS（triglycine sulfate）検出器では，十分な S/N 比のスペクトルは得られない．MCT 検出器は，感度が高いものほど，低波数側の測定範囲が狭くなる．いわゆる狭帯域 MCT では～800 $cm^{-1}$ までの測定が可能であり，中帯域で～600 $cm^{-1}$，広帯域では～420 $cm^{-1}$ 以上となる．600 $cm^{-1}$ 以下の低波数振動を測定したい場合には，Si ボロメータを用いるのが一般的である[15]．

光合成試料のような光応答性試料の測定で特に注意が必要なのは，干渉計から試料室に漏れ出てくる He-Ne レーザーの赤色光を，光学フィルターで除去することで

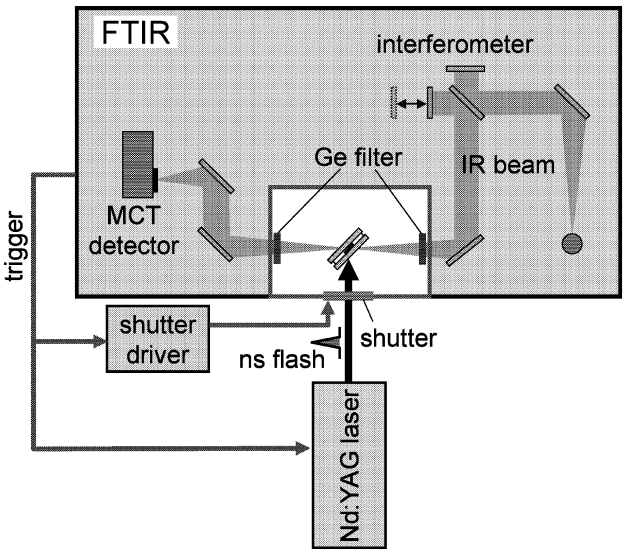



**図 1**：光誘起 FTIR 差スペクトル測定システム．ここでは，Nd：YAG レーザーのパルス光を用いて水和試料を励起し，FTIR 差スペクトルを測定する場合を示している．

ある．4000–650 $cm^{-1}$ の領域を透過する Ge 基板の多層膜干渉フィルターを用いれば，通常の赤外領域をカバーできる．様々な透過領域の赤外フィルターが市販されているので，目的に応じて選択する．フィルターは赤外ビームに沿って試料の前に置く．また，光照射に尖頭値の高いパルス光を用いる際には，その反射光が検出器の素子を傷めるので，試料と検出器の間にもフィルターを置く必要がある．

試料への光照射には，目的に応じて，定常光やパルスレーザーからの閃光を用いる．図 1 の例では，試料を赤外ビームに対して 45°傾け，パルスレーザー光を直角方向から入射している．試料室の光照射用の窓には電磁シャッターを設置する．光照射及びシャッターの開閉は，FTIR 分光計からの TTL トリガを用いてコントロールし，スペクトル測定と同期させる．

### 2.e.3.2 試料部

試料を挟む赤外透過板には，通常，水に不溶・難溶性の $CaF_2$ や $BaF_2$ を用いる．$BaF_2$ の方が低波数側の透過域が広いが（$BaF_2$：＞700 $cm^{-1}$；$CaF_2$：＞1100 $cm^{-1}$），わずかに水に溶けるので，長時間常温で水溶液試料に接するような使用法は避けた方がよい．より低波数の測定には ZnSe（＞450 $cm^{-1}$）や AgBr（＞300 $cm^{-1}$）などを使うことができる．

試料は，なるべく濃い状態で，これらの赤外透過板に挟む．水の赤外吸収バンド（OH 伸縮振動：～3400 $cm^{-1}$；HOH 変角振動：～1640 $cm^{-1}$）が蛋白質のバンドに重なるためである．1650 $cm^{-1}$ 付近のバンド（水の

HOH 変角振動＋蛋白質のアミドⅠ振動）の吸光度を１以下に抑えるようにする．膜試料の場合には，遠心によって得たペレットを細いガラス棒などで掻き取り，赤外透過板の上に載せて，もう一枚の窓板に挟んで押し込むとよい．押し込む力の程度で試料の厚さをコントロールできる．溶液試料の場合には，濃縮した試料を窓板上で窒素ガスなどを用いて軽く乾燥させ，他の窓板に１$\mu$L 程度の水を載せて挟む．

FTIR 差スペクトル測定用の試料作成において特に重要な点は，試料の変動を極力抑えることである．試料の変動はベースラインの歪みとなって現れ，正しいスペクトルを測定する妨げとなる．そこで，クライオスタットを用いて試料を凍結するのがよい．低温測定は，中間状態の寿命を延ばし，差スペクトルの S/N 比を向上させるのにも有効である．また，低温において電子伝達鎖の一部の反応が阻害されることから，特定の電子伝達成分のスペクトルを選択的に測定するための条件ともなる．

FTIR 差スペクトル測定に有効なもう一つの試料形態は，蛋白質あるいは膜標品の水和試料である（図２a）[16]．溶液試料を窓板上で適度な大きさに広げ，窒素ガスで軽く乾燥させる．この試料を，シリコーングリースを塗ったスペーサーともう一枚の窓板で密閉する．この密閉した赤外セル中には，試料に触れないようにグリセリン水溶液を数$\mu$L 入れておき，セル中の相対湿度をコントロールする．グリセリンと水の割合を変えることにより，試料の水和量を変化させることができる．20-40%（V/V）グリセリン水溶液を用いれば，活性を保ったまま適度に水和した試料が得られる．このような水和試料を用いることにより，常温に近い温度において，試料の変動を抑えて測定を行うことが可能となる．冷水を循環させた銅製ホルダーなどに試料を取り付け，温度をコントロールする．この水和試料の最大の利点は，バルクの水の吸収バンドを最小限に抑えることによって，そこに重なる蛋白質や蛋白質内水分子のバンドの測定が可能になることである．例えば，この試料を用いて，光化学系Ⅱにおける水分解（酸素発生）系の基質水分子の反応を調べることができる[17,18]．

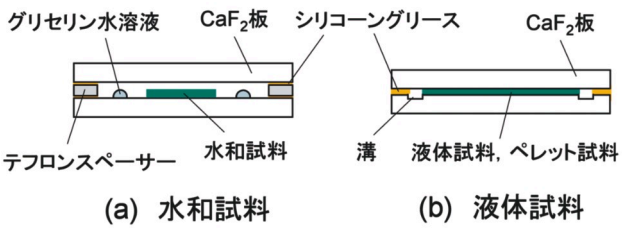



**図２**：FTIR 差スペクトル測定用試料セルの例．（a）水和試料；（b）液体またはペレット試料．

溶液試料またはペレット試料をそのまま，常温に近い温度で測定するためには，溝付き窓板を用いるとよい（図２b）[19,20]．溝の外側にシリコーングリースを塗り，内側に試料を置いて挟む．ホルダーで押さえつける力の加減によって，試料の厚さをある程度コントロールできるが，必要ならば，外側のグリース部にアルミホイルの小片を置いて試料の厚み（数$\mu$m）を確保する[21]．凍結試料や水和試料に比べてベースラインは変動しやすいので，スキャン時間を短くしたり，ベースラインの変動を暗中で別に測定しておいて光誘起差スペクトルから差し引くなどの工夫をする．

### 2.e.3.3　全反射吸収法の利用

上で述べた透過法に対し，全反射吸収法（ATR 法）を利用して測定することも可能である[22,23]．ATR 法は，ATR 結晶と試料の界面において赤外光が全反射する際の，試料側へのわずかな潜り込みを利用して赤外吸収を測定する手法である．ATR 結晶上に試料を吸着させることにより，緩衝液を自由に交換することができ，同一試料を用いて様々な条件下での測定が可能になる[23]．

塩や界面活性剤を極力除いた試料を ATR 結晶上で適度に乾燥させてそれに吸着させ，ホルダーを取りつけた後，緩衝液を流して安定させる．ATR 結晶に Si や Ge など，可視光を透過しないものを用いれば，He-Ne レーザー光を除去するための赤外フィルターは不要である．光照射によって光誘起差スペクトルを測定するだけではなく，酸化還元剤によって電位を変えた緩衝液を交換し，その際の酸化還元差スペクトルを測定することも可能である[22]．ATR 法は将来性のある有力な手法であるが，光合成試料への応用例は多くはなく，方法論の確立にはまだ時間が必要である．

### 2.e.3.4　差スペクトルの計算法

FTIR 差スペクトル法では光照射前後（または光照射前と光照射中）で赤外スペクトルを測定し，その差スペクトルを計算する．入射赤外光強度を $I_0$，光反応前後での透過赤外光強度をそれぞれ $I_D$，$I_L$ とすると，光反応前後での吸光度 $A_D$，$A_L$ の差 $\Delta A$ は，

$$\begin{aligned}\Delta A = A_L - A_D &= -\log(I_L/I_0) + \log(I_D/I_0) \\ &= -\log(I_L/I_D)\end{aligned} \qquad (1)$$

で表される．よって，実際には光照射の前後でシングルビームスペクトル（$I_D$，$I_L$）を測定し，それらを使って吸光度計算をすれば差スペクトルを計算したのと同じことになり，試料の赤外吸収スペクトルそのもの（$A_D$，$A_L$）を測定する必要はない．しかし，測定したい領域の吸収

が飽和していないかどうか，試料が均一な状態かどうか（不均一の場合，部分的に飽和するため，バンドがつぶれた形になる）などを確認するため，試料のない状態でレファレンススペクトル（$I_0$）を測定しておき，$A_D$ のスペクトルを確認しておくべきである．

### 2.e.3.5 FTIR 差スペクトル測定における注意

FTIR 差スペクトル測定の際には，いくつか注意すべきことがある．紫外・可視分光では問題にならない事柄がほとんどであるので，同じ感覚で FTIR スペクトルを測定すると，誤ったスペクトルを測定してしまうことになる．また，$\Delta A$ で $10^{-4}$－$10^{-5}$ オーダーのバンドを観測するため，測定系と試料系を安定させ，慎重に測定を行う必要がある．FTIR 差スペクトルは，正しく測定すれば，極めて再現性が良く，別の測定系を用いても基本的に全く同じスペクトルが得られる．しかし，誤った測定法のために，〝artifact〟バンドを正しいものとして報告している例がかなりあるので注意が必要である．

まず，赤外スペクトルは温度変化に極めて敏感であるため，温度コントロールを精密に行う必要がある．クライオスタットで温度を設定した場合には，目的の温度で安定するまで根気よく待たねばならない．暗状態で差スペクトルを測定し，蛋白質の赤外吸収の変化が無くなるのを確認する．最も気を付ける必要があるのは，試料の光吸収による局所的な温度上昇によって現れる，いわゆる「熱バンド」である．水の温度上昇はコールドフィルターによって近赤外光を除くことで防ぐことができるが，クロロフィルなどのアンテナ色素の光吸収による温度上昇は，ある程度避けられない．なるべく強度を抑えた飽和光を用い，また，長波長側の吸収帯（クロロフィルの Qy 帯など）で励起するようにするなど，余分な熱を発生させない工夫が重要である．また，定常光励起の場合には，照射時間をなるべく短時間（典型的には 10 秒以下）に抑えるようにする．強光または長時間照射を行って，熱バンドの位置や形を把握して，実際の光照射条件によって，熱バンドが現れないかどうかを確認しておくことは有効である[24]．

FTIR 分光計では乾燥ガスのパージや真空引きなどによって水蒸気を除く工夫がなされているものの，その振動回転遷移による複数のピーク（4000–3400 及び 2000–1300 $cm^{-1}$）を完全に除くのは困難である．赤外光路中の水蒸気量の微妙な変化によって，水蒸気のピークが差スペクトルに重なる場合が多い．蛋白質やコファクターのバンドが現れない 2000–1800 $cm^{-1}$ の領域にも鋭い複数のピークが現れるので，判別は容易である．目的とするバンドに対して水蒸気のピークが比較的小さい場合には，あらかじめ試料のない状態で測定しておいた水蒸気のスペクトルを差し引くことによって，それらを除くことができる．水蒸気のバンドが非常に大きい場合には，このような補正操作をしても，異なる条件下で測定した水蒸気のスペクトルの微小な違いによって，水蒸気のピークを完全にはキャンセルできない場合がある．そのような場合には，光誘起差スペクトル測定の直前に暗状態での差スペクトルを測定し，そこに現れる水蒸気のピークを用いて差し引く．二重差スペクトルを取ることによってスペクトルの S/N 比は下がるが，正しいスペクトルを得ることを優先しなければならない．

装置の安定性は，FTIR 差スペクトルを測定する上で重要な要素である．通常の FTIR 差スペクトル測定に要する数十秒から分オーダーでの分光計の安定性は，装置仕様上の S/N 比などでは表すことができない．安定性が悪い場合には，試料の大きな赤外バンド（例えば蛋白質のアミド I バンド）の領域に変化が生じ，ベースラインの歪みの原因となる．乾燥ガスの圧力変動や，電圧変化，室内温度の変化などを極力抑える必要がある．安定した試料に対し，暗状態で差スペクトルを測定することにより，測定系の安定性を確認しておく必要がある．

## 2.e.4 スペクトル解析法

得られた FTIR 差スペクトルには，構造変化を起こした複数の分子・置換基の赤外吸収が現れるので，バンドの帰属を慎重に行う必要がある．およその帰属は，経験的なグループ振動によって行うことができる[25]．しかし，複数の振動モードが現れる波数領域については，より正確な帰属を行うために，様々な安定同位体置換が必要となる．蛋白質全体の $^{15}N$，$^{13}C$ 置換[26]，や各アミノ酸側鎖の選択的同位体置換（例えば，[4-$^{13}$C]Tyr や [$^{15}$N]His など）[27,28]，同位体ラベルしたコファクターの再構成[29] などが一般に行われる．重水中での測定により，解離性プロトンを含む振動を同定することができる．また，$H_2{}^{18}O$ 及び $D_2{}^{18}O$ 置換は，水分子のバンドの帰属を与える[17,18]．部位特異的変異導入によるアミノ酸改変も有効な手段である[30]．但し，変異による二次効果がスペクトル上に現れる可能性が高いので，スペクトルの解釈の際には十分に注意する必要がある．

最近は，密度汎関数法などによる量子化学計算を，研究室のコンピュータを用いて手軽に行えるようになった．モデル化合物の量子化学計算による振動解析によって，各アミノ酸側鎖やコファクターの振動数と赤外強度を求め，バンドの帰属に役立てることができる[31–33]．

赤外スペクトルやラマンスペクトルのような振動スペクトルには，様々な構造や相互作用の情報が含まれる．しかし，振動モードにはそれぞれ個性があり，振動数や強度から構造情報を導くための解析基準は，対象とする置換基ごとに異なる．多くの置換基について，そのような解析基準が経験的に得られている．例えば，カルボキシル基(COO⁻)の配位構造(単座配位，架橋配位，キレート配位）に関しては，対称及び逆対称伸縮振動の振動数差との相関が知られている[34,35]．また，クロロフィル類のケト C=O 基の伸縮振動と水素結合構造や極性環境との関係も調べられている[36,37]．このような解析基準が確立されていない場合には，モデル化合物の実測と，様々な相互作用構造を仮定したモデル系の量子化学計算から，振動数や強度と構造との相関を求める[32,33]．

## 2.e.5 測定例

光化学系 I，II及び光合成細菌の反応中心における各反応性コファクターの FTIR 差スペクトルの測定に関しては，それぞれの試料系について既にほぼ確立した手法がある．総説[9−14,30,38] と引用されている原著論文を参照していただきたい．重要なことは，目的とするコファクターのみを反応させるような条件下で測定を行うことである．そのためには，試料形態(膜標品，光化学系 I，IIコア複合体，反応中心蛋白質など)，特定のコファクターの除去(マンガンクラスター除去，$Q_A$ 除去など)，温度(低温における電子伝達反応の阻害)，緩衝液の酸化還元電位，励起光（定常光，閃光）などの条件を様々に変える必要がある．

反応中心における電荷分離反応により，必ず酸化側と還元側の変化が同時に起こる．単一のコファクターの反応によるスペクトルのみを測定したいときには，適当な電子受容体または電子供与体を添加し，電子または正孔を蛋白質の外に逃がすようにする．その際，フェリシアン化物イオンのような無機物を使うと，そのバンドが蛋白質のバンドを重ならず，都合がよい．酸化側，或いは還元側のどちらかが測定できれば，電荷分離による差スペクトルとの二重差スペクトル計算し，もう片方のスペクトルを求めることもできる．以下に，光化学系IIの第一電子受容体 $Q_A$ と酸素発生系についての測定例を示す．

### 2.e.5.1 光化学系IIの第一電子受容体 $Q_A$[39,40]

ホウレンソウより調製した光化学系II膜標品を緩衝液（40 mM Mes-NaOH，400 mM sucrose，20 mM NaCl；pH 6.5）に懸濁し（0.5 mg Chl/ml），$NH_2OH$（最終濃度 10 mM）及びジクロロフェニルジメチル尿素（DCMU）（最終濃度 0.1 mM）を加える．$NH_2OH$ 処理によりマンガンクラスターは除去され，また同時に，$NH_2OH$ は測定の際の外来電子供与体としても働く．DCMU によって $Q_A$ から $Q_B$ への電子伝達は阻害される．マンガンクラスター除去にはトリス処理（0.8 M Tris-HCl，pH 8.5)を行ってもよい．また，$Q_A^-$ アニオンの再酸化を速めて繰り返し測定を行うために，phenazine methosulfate（PMS）などの酸化還元メディエータを加えることもあるが[41]，PMS の変化がキノンのスペクトルに重なることがあるので注意が必要である．

この試料を 150,000 G で 30 分遠心し，膜標品のペレットを得る．ペレットをガラス棒ですくって $CaF_2$ 窓板(直径 13 mm）上へ置き，別の $CaF_2$ 板で挟んで押し込む．試料が窓板全体に均一に広がるように押し込むのが，ベースラインの変動が少ないきれいなスペクトルを測定するこつである．試料をクライオスタット（Oxford DN1704）へ挿入し，250 K に設定する．暗状態で差スペクトル測定を行い，試料の温度が一定となりベースラインが安定するのを待つ．赤色光(～30 mW/cm²)で 10 秒間試料を照射し，その前後でそれぞれシングルビームスペクトル（150 s スキャン）を測定し，差スペクトルを計算する．

得られたスペクトルを図 3 に示す．負のバンドは中性 $Q_A$，正のバンドは $Q_A^-$ アニオン状態のときのプラストキノン及び蛋白質のバンドであり，この反応によって変化した構造部分が現れている．最も顕著なバンドは 1479

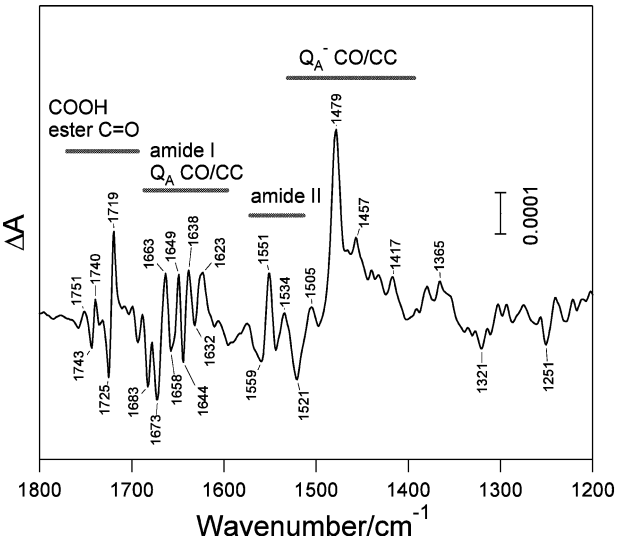



**図 3**：光化学系 II における第一キノン電子受容体 $Q_A$ の一電子還元による光誘起 FTIR 差スペクトル．試料はホウレンソウより調製した光化学系 II 膜標品．電子供与体として $NH_2OH$，電子伝達阻害剤として DCMU を含む．温度は 250 K．

$cm^{-1}$ のセミキノンアニオンの CO 伸縮振動と CC 伸縮振動がカップルしたバンドである．このバンドの振動数は 2 つの CO 基の水素結合強度やその対称性によって変化するため，水素結合構造を調べる指標となる．例えば，シアン処理により鉄中心に $CN^-$ が結合すると，水素結合状態が変わり，4 $cm^{-1}$ の低波数シフトを示す[39]．また，$Q_B$ 部位に様々な除草剤を結合させると，フェノール系除草剤が結合したときのみ，このピークは小さな（〜1 $cm^{-1}$）低波数シフトを示す．この水素結合構造の変化と $Q_A$ の酸化還元電位とは相関が見られ，$Q_B$ 部位に結合した除草剤が $Q_A$ の相互作用に影響を及ぼしていることがわかる[40]．

### 2.e.5.2　酸素発生系の S 状態サイクル[16,17]

パルスレーザーを用いて酸素発生反応における S 状態サイクルを 1 ステップずつ動かすことにより，各 S 状態遷移の際の FTIR 差スペクトルを測定することができる．

好熱性シアノバクテリア *Thermosynechococcus elongatus* の光化学系 II コア蛋白質を緩衝液（10 mM MES-MaOH，5 mM NaCl，5 mM $CaCl_2$，0.06% *n*-dodecyl $\beta$-D-maltoside）に懸濁し（4.5 mg Chl/ml），4 $\mu$L を取って 100 mM フェリシアン化カリウム水溶液 1 $\mu$L と混合する．それを $CaF_2$ 板（直径 25 mm）上で楕円状（6×9 mm）に引き伸ばし，窒素ガスを用いて軽く乾燥させる．20%（V/V）グリセリン水溶液 2 $\mu$L を試料に触れないように周りに置き，シリコーングリースを塗ったテフロンスペーサ（厚さ 0.5 mm）と別の $CaF_2$ 板で密閉する（図 2 a）．試料は銅製ホルダーで押さえ，冷水を流して 10°C に保つ．試料を 1 時間程その状態で放置し，試料が十分に水和し，安定するまで待つ．FTIR スペクトルを測定することによって水和の過程を追うことができる．

Q スイッチ Nd: YAG レーザーからの 532 nm のナノ秒パルス光（〜7 ns：〜10 mJ $pulse^{-1}cm^{-2}$）を用いて試料に光照射を行う．まず，酸素発生系を $S_1$ 状態に揃えるため，2 発の閃光（1 Hz）を照射し，1 時間暗順応させる．その後，10 秒間隔で 4 発の閃光を照射し，その閃光照射の前，閃光間，閃光後の FTIR スペクトルを測定する．サンプルを 1 時間暗順応させ，このサイクルを繰り返すことによってスペクトルの S/N 比を向上させる．

このようにして得られた各閃光照射における FTIR 差スペクトルを図 4 に示す．フェリシアン化物イオンによって，キノン電子受容体から電子を蛋白質の外に引き抜くことにより，基本的に酸素発生系のみに由来するスペクトルが得られている．1，2，3，4 閃光目のスペクトルは，それぞれ $S_1 \rightarrow S_2$，$S_2 \rightarrow S_3$，$S_3 \rightarrow S_0$，$S_0 \rightarrow S_1$ 遷移

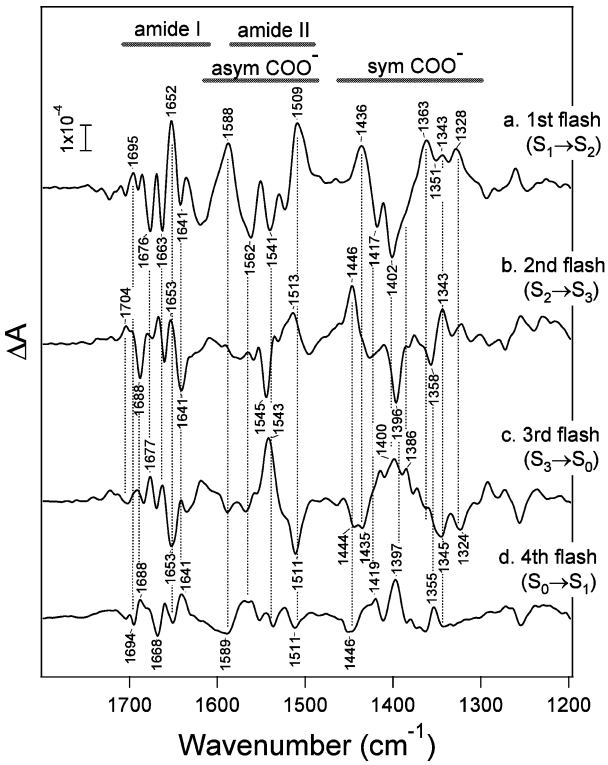



**図 4**：光化学系 II における酸素発生 S 状態サイクルの閃光誘起 FTIR 差スペクトル．1 (a)，2 (b)，3 (c)，4 (d) 閃光目のスペクトルは，それぞれ S 状態サイクルの $S_1 \rightarrow S_2$，$S_2 \rightarrow S_3$，$S_3 \rightarrow S_0$，$S_0 \rightarrow S_1$ 遷移の際の構造変化を示す．試料は好熱性シアノバクテリア *T. elongatus* より調製した光化学系 II コア蛋白質複合体の水和試料．電子受容体としてフェリシアン化物イオンを含む．温度は 10°C．

の際の構造変化を表している．実際には 12%程のいわゆるミスファクターがあるので，後のスペクトルほど，他の遷移の混入が増えてくる．しかし，ミスファクターを考慮して補正をしてもスペクトルの形自体は大きくは変化しないので定性的な議論をするには問題がない．

どのスペクトルにも，カルボキシル基の逆対称伸縮振動（1600–1500 $cm^{-1}$），及び対称伸縮振動（1450–1350 $cm^{-1}$）の領域に複数の顕著なバンドが現れている．特に，後者の領域のバンドは $^{15}N$ 置換で全く変化せず，$^{13}C$ 置換によってすべて低波数シフトを示したことから，これらは基本的にすべてカルボキシル基の振動であると帰属されている[26]．1760–1700 $cm^{-1}$ の COOH 基の C=O 伸縮振動の領域には顕著なバンドが観測されないことから，これらのバンドはカルボキシル基のプロトン化反応によって現れているのではなく，脱プロトン化した状態で，配位子として，または水素結合を通してマンガンクラスターと相互作用し，反応に関与していると考えられる．また，アミド I 領域（1700–1600 $cm^{-1}$）にも多数のバンドが観測され，蛋白質の二次構造が酸素発生反応の過

程で大きく変化することが分かる．

それぞれのバンドに対応して，別の遷移において，ほぼ同じ振動数のバンドが逆の符号で現れており，マンガンクラスターの配位子及びその近傍の構造がS状態サイクルの中で周期的変化をすることが明瞭に表されている．図4のスペクトルは，酸素発生反応の際の蛋白質骨格や個々のアミノ酸側鎖の動きを，中間状態ごとに原子・分子レベルで追跡できることを表している．

## 参考文献


1）水島三一郎，島内武彦，「赤外線吸収とラマン効果」，共立出版，1958．
2）中川一朗，「振動分光学」，学会出版センター，1987．
3）D. M. Byler & H. Susi, *Biopolymers* **25** (1986) p.469.
4）田隅三生　編著，「FT-IRの基礎と実際」，第2版，東京化学同人，1994．
5）平石次郎，「フーリエ変換赤外分光法 ── 化学者のためのFT-IR」，学会出版センター，1985．
6）W. Mäntele, *Trends Biochem. Sci*. **18** (1993) p.197.
7）R. Vogel & F. Siebert, *Curr. Opin. Chem. Biol*. **4** (2000) p.518.
8）C. Zscherp & A. Barth, *Biochemistry* **40** (2001) p.1875.
9）W. Mäntele, Anoxygenic Photosynthetic Bacteria, eds. R. E. Blankenship, M. T. Madigan & C. E. Bauer, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1995, p.627.
10）W. Mäntele, Biophysical Techniques in Photosynthesis, eds. J. Amesz & A. J. Hoff, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands, 1996, p.137.
11）J. Breton & E. Nabedryk, *Biochim. Biophys. Acta* **1275** (1996) p.84.
12）J. Breton, *Biochim. Biophys. Acta* **1507** (2001) p.180.
13）T. Noguchi & C. Berthomieu, Photosystem II: The Light-Driven Water: Plastoquinone Oxidoreductase, eds. T. Wydrzynski & K. Satoh, Springer, Dordrecht, The Netherlands, 2005, p.367.
14）T. Noguchi, *Photosynth. Res*. **91** (2007) p.59.
15）H.-A. Chu, M. T. Gardner, W. Hillier & G. T. Babcock, *Photosynth. Res*. **66** (2000) p.57.
16）T. Noguchi & M. Sugiura, *Biochemistry* **41** (2002) p. 2322.
17）T. Noguchi & M. Sugiura, *Biochemistry* **41** (2002) p. 15706.
18）H. Suzuki, M. Sugiura & T. Noguchi, *Biochemistry* **47** (2008) p.11024.
19）R. Hienerwadel, D. Thibodeau, F. Lenz, E. Nabedryk, J. Breton, W. Kreutz & W. Mäntele, *Biochemistry* **31** (1992) p.5799.
20）T. Noguchi & M. Sugiura, *Biochemistry* **40** (2001) p. 1497.
21）H. Suzuki, Y. Taguchi, M. Sugiura, A. Boussac & T. Noguchi, *Biochemistry* **45** (2006) p.13454.
22）M. Iwaki, S. Andrianambinintsoa, P. Rich & J. Breton, *Spectrochim. Acta A* **58** (2002) p.1523.
23）T. Okubo & T. Noguchi, *Spectrochim. Acta A* **66** (2007) p.863.
24）K. Onoda, H. Mino, Y. Inoue & T. Noguchi, *Photosynthesis Research* **63** (2000) p.47.
25）G. Socrates, Infrared characteristic group frequencies, John Wiley & Sons, Chichester, 1994.
26）T. Noguchi & M. Sugiura, *Biochemistry* **42** (2003) p. 6035.
27）T. Noguchi, Y. Inoue & X.-S. Tang, *Biochemistry* **38** (1999) p.10187.
28）T. Noguchi, Y. Inoue & X.-S. Tang, *Biochemistry* **36** (1997) p.14705.
29）J. Breton, J.-R. Burie, C. Berthomieu, G. Berger & E. Nabedryk, *Biochemistry* **33** (1994) p.4953.
30）R. J. Debus, *Coord. Chem. Rev*. **252** (2008) p.244.
31）K. Hasegawa, T. Ono & T. Noguchi, *J. Phys. Chem. B* **104** (2000) p.4253.
32）R. Takahashi & T. Noguchi, *J. Phys. Chem. B* **111** (2007) p.13833.
33）K. Takei, R. Takahashi & T. Noguchi, *J. Phys. Chem. B* **112** (2008) p.6725.
34）G. B. Deacon & R. J. Phillips, *Coord. Chem. Rev*. **33** (1980) p.227.
35）K. Nakamoto, Infrared and Raman spectra of inorganic and coordination compounds (5th Ed.), part B, John Wiley & Sons, New York, 1997, p.59.
36）S. Krawczyk, *Biochim. Biophys. Acta* **976** (1989) p.140.
37）Y. Koyama, Y. Umemoto & A. Akamatsu, *J. Mol. Struct*. **146** (1986) p.273.
38）T. Noguchi, *Coord. Chem. Rev*. **252** (2008) p.336.
39）T. Noguchi, J. Kurreck, Y. Inoue & G. Renger, *Biochemistry* **38** (1999) p.4846.
40）A. Takano, R. Takahashi, H. Suzuki & T. Noguchi, *Photosynth. Res*. in press.
41）C. Berthomieu, E. Nabedryk, W. Mäntele & J. Breton, *FEBS Lett*. **269** (1990) p.363.

# 2．分光測定法
## f．共鳴ラマン分光法

野口　　巧[1)]

共鳴ラマン分光法は，光合成試料中におけるクロロフィルやカロテノイドなどの色素の構造や相互作用を調べるのに極めて有効な手法である．本稿では共鳴ラマンスペクトルの測定法と解析法について解説する．

## Resonance Raman spectroscopy

Takumi Noguchi

Resonance Raman spectroscopy is a very useful method to study the structures and interactions of pigments such as chlorophylls and carotenoids in photosynthetic proteins.　In this article, the methods of measurements and analysis of resonance Raman spectra are explained.

### 2.f.1　はじめに

分子の振動スペクトルを測定する主な手法としては，赤外分光法の他に，ラマン分光法がある．共鳴ラマン法を用いることにより，多成分からなる光合成試料において，クロロフィルやカロテノイドなど，特定の色素のラマンスペクトルを選択的に測定することができる．したがって，蛋白質中の色素の構造や相互作用を，蛋白質や水のバンドに妨害されることなく調べることが可能となる．赤外分光法と同様に，共鳴ラマン法が与える構造情報は，水素結合構造など，X線結晶解析によって得られる情報と相補的なものを含んでおり，また微小な構造の違いに敏感である．ラマン散乱の原理，及び測定法については成書に詳しく述べられている[1)]．ここでは，光合成試料の共鳴ラマンスペクトルの一般的な測定法について述べる．共鳴ラマン法の光合成系への応用については，過去に多くの総説が出されているので，それらも参照されたい[2−7)]．

### 2.f.2　共鳴ラマン散乱

ラマン分光法では，物質に単色レーザー光を入射したときの散乱光を観測する．その散乱光の中には，レーザー光と同じ振動数を持つレイリー散乱の他に，分子振動の振動数分だけシフトしたラマン散乱光が存在している．ラマン散乱の原理は，定性的には，入射光によって誘起される双極子モーメントの強制振動に，分子振動が重なることによる「うなり」の現象として理解することができる．入射光よりも小さい振動数の散乱光をストークス散乱，逆に大きい振動数の散乱光をアンチストークス散乱と呼ぶ．常温では，分子はほとんど振動基底状態にあるため，振動準位が一つ上に遷移するストークス散乱の方が，アンチストークス散乱に比べて遥かに強い強度を持つ．そのため，通常は入射レーザー光よりも長波長側でラマン散乱を観測し，入射光の振動数からのシフト値（ラマンシフト）を横軸にとってスペクトルを表示する．

ある分子の電子吸収帯と一致する波長の光を入射すると，共鳴効果により，その電子遷移に共役する振動のラマン散乱光が著しく増大する．これを共鳴ラマン散乱と呼ぶ（図1）．共鳴ラマン法を用いると，蛋白質，脂質，水など複合的な成分を持つ試料中において，特定の分子の振動スペクトルを，励起波長を変えることにより，選択的に測定することができる．光合成試料におけるラマンスペクトル測定の対象は，ほとんどの場合，カロテノイドとクロロフィル・フェオフィチン類である．これらの$\pi$電子共役系を持つ色素では，共役系に含まれる構造部分の振動モードだけがスペクトル上に現れる．

電子吸収帯に一致した励起光による真正共鳴ラマン散乱に対し，それよりもやや長波長側の励起光によるラマン散乱を前期共鳴ラマン散乱と呼ぶ（図1）．この前期共鳴条件でもある程度の共鳴効果が得られ，ラマン散乱光の強度増大が見られる．よってスペクトルは，非共鳴ラマン散乱とは異なり，やはり近くの電子遷移の性質を反映したものとなる．

1）筑波大学　大学院数理物質科学研究科　物性・分子工学専攻

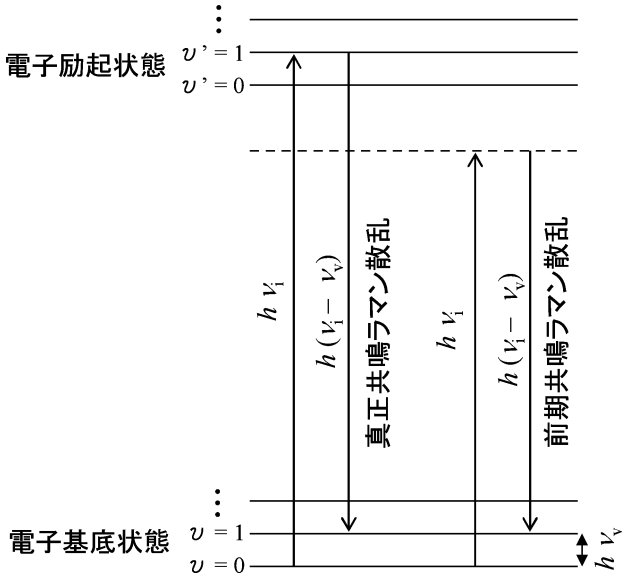



図 1：真正共鳴ラマン散乱と前期共鳴ラマン散乱．

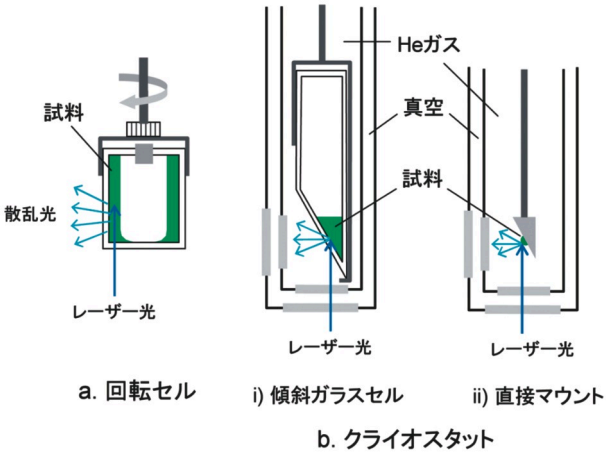



図 2：光合成試料に適したラマン散乱測定の試料部．(a) 液体試料用回転セル．(b) クライオスタットによる試料凍結；(i) 傾斜石英ガラスセル，(ii) 直接マウント試料．

## 2.f.3　測定法

ラマンスペクトルの測定系は，レーザー光源，試料部，分光器，検出器よりなる．光合成試料の共鳴ラマンスペクトルの測定は，紫外から近赤外にわたる広い波長領域で行われる．通常は分散型分光器を用いて測定を行うが，近赤外領域の測定においては，フーリエ変換 (FT) 赤外分光計を用いた FT ラマン法を用いることができる．これは異なる原理の測定法であるため，他とは区別して述べることとする．

### 2.f.3.1　レーザー光源

励起光として，$Ar^+$ レーザー，$Kr^+$ レーザー，He-Cd レーザーなどの各発振線，及び波長可変の Ti: sapphire レーザーや色素レーザーからの光を用いることができる．目的とする色素の吸収帯に合わせて励起光を選択する．

カロテノイドの共鳴ラマンスペクトルの測定には，$Ar^+$ レーザーの 514.5 または 488.0 nm の発振線が最もよく用いられる．これらの波長領域にはクロロフィルの吸収帯が存在しないため，その共鳴ラマン散乱の混入を防ぐことができる．

一方，クロロフィル・フェオフィチン類の測定には，通常，Soret 帯を励起するレーザー光を用いる．クロロフィルの種類によって Soret 帯の位置はそれぞれ異なるので，用いる励起光もそれに合うものを用いる．クロロフィル $a$ の場合には，He-Cd レーザーの 441.6 nm の発振線，フェオフィチン $a$ には $Kr^+$ レーザーの 406.7 または 413.1 nm の発振線などが用いられる．これらの青色レーザー光ではカロテノイドも同時に励起してしまうが，クロロフィルやフェオフィチンの構造情報を示すマーカーバンド（4.参照）はカロテノイドのバンドとほとんど重ならないため特に問題にはならない (図 2)．バクテリオクロロフィル $a$ の場合には，紫外域にある Soret バンドを励起するため，$Ar^+$ レーザーの 363.8 nm の発振線を用いる．

クロロフィル類の Qy 帯への真正共鳴ラマン散乱は，強い蛍光によって妨害されるため，一般的には観測が困難である．しかし，光合成細菌の反応中心蛋白質などでは，励起波長の選択とスペシャルペアの酸化状態により，各コファクターの共鳴ラマンスペクトルを選択的に測定することが可能である[8–10]．また，SERDS（Shifted-excitation Raman difference spectroscopy）法によって，数 $cm^{-1}$ だけ異なる励起光を用いてラマン散乱を測定し，その差を計算して蛍光によるバックグラウンドを除去するという手法もしばしば用いられる[11,12]．これらの測定には，750–900 nm に存在するバクテリオフェオフィチン及びバクテリオクロロフィルの Qy 帯に合わせて，連続波長可変の Ti：sapphire レーザーや色素レーザーが用いられる．

### 2.f.3.2　分光器

ラマン散乱を測定する際に最も注意を要することは，強いレイリー散乱光を除去して迷光を除くことである．そのために，以前は，ダブルモノクロメータやトリプルモノクロメータを用いるのが一般的であったが，スループットが低くなるという欠点があった．現在では，ノッチフィルターなどによってレイリー光を選択的に除去し，シングルモノクロメータで測定するという手法がよく使われる．それぞれの励起光に対して基本的に別の

フィルターを用意しなければならないが，フィルターを傾けることにより，若干カットオフ波長をシフトさせることができる．

#### 2.f.3.3　検出器

検出器として光電子増倍管を用いる場合には，モノクロメータをスキャンしてラマンスペクトルを測定する．近年では，分光器をポリクロメータとして用いて，高感度 CCD 検出器（charge coupled device）によって広い波数領域を一度に測定するのが一般的である．

#### 2.f.3.4　試料部

光合成試料などで共鳴ラマンスペクトルを測定する際の注意は，レーザー光照射による色素および蛋白質試料の破壊，不活性化をなるべく防ぐことである．液体試料で測定する際には，回転セル（図 2 a）を用いて試料を回転させることにより，同じ試料に励起光が当たるのを避けるようにする．光吸収による試料温度の上昇を防ぐためには，冷 $N_2$ ガスなどを回転セルに吹き付けて，試料を冷やすとよい．

また，クライオスタットを用いて試料を凍結させることにより，試料を動かさなくとも，励起光による温度上昇と試料の破壊を抑えることができる（図 2 b）．図 2 b（ii）の様に，金属ホルダーに直接試料溶液を載せて凍結すれば，10 $\mu$L くらいの少量の試料で測定が可能である．また，レーザー光を直接試料に照射できるので，ガラスセルからのラマン散乱の混入を避けることができる．

#### 2.f.3.5　波数較正

ラマンスペクトルの横軸は励起光からのラマンシフトで表わされるため，波数較正が必要となる．特に，CCD 検出器を用いる際には，生データの横軸は素子のチャンネル数であるため，標準物質のラマン散乱を用いてスペクトルの較正を行う．標準物質としては，一般的なラマン測定ではインデンが用いられる場合が多いが，クロロフィル類のマーカーバンドが現れる 1600–1750 $cm^{-1}$ の領域にバンドを持たないため，光合成試料に対する標準としてはあまり有用とは言えない．アセトンや酢酸エチルなど，この波数領域に C＝O 伸縮振動バンドを持つ溶媒が有用である．標準溶媒のラマンスペクトルは成書[1]の付録に纏められているので利用するとよい．

#### 2.f.3.6　フーリエ変換ラマン法

近赤外励起のラマン散乱測定法として，FT ラマン法が普及している．励起光としては Nd：YAG レーザーの 1064 nm の発振線が主に用いられ，試料からの散乱光をフーリエ変換赤外分光計に導入し，そのスペクトルを観測する．検出器としては，近赤外領域に感度を持つ，In-GaAs 検出器や Ge 検出器などを用いる．この励起波長は，クロロフィル類に対しては前期共鳴条件となり，蛍光による妨害を回避してラマン散乱を測定することができる[13,14]．一方，カロテノイドのラジカルカチオンなどのように，1000 nm 付近に吸収帯をもつ分子種に対しては真正共鳴ラマン散乱の測定となる[15]．FT ラマン法は，光合成細菌の第一電子供与体バクテリオクロロフィルの水素結合状態の解析に有効に利用されている[16]．

### 2.f.4　スペクトル解析

共鳴ラマンスペクトルでは，共鳴条件にある特定の色素の振動のうち，励起電子遷移に共役するもののみが観測されるため，バンドの帰属は比較的容易である．励起波長を変えて測定すれば各色素への帰属も容易に判断でき，同位体置換が必要になることもあまりない．ただし，試料中に同じ吸収帯をもつ同種の色素が多数含まれている場合には，それらのラマンバンドが重なって現れる．よって，各コファクターを識別するためには，酸化還元電位を変えて活性種の割合を変化させ，その差スペクトルを測定するなどの工夫が必要となる．

各色素のラマンスペクトルは，抽出精製物として様々な溶媒中で測定されており，構造情報を導き出すためのマーカーバンドもほぼ確定している[2–7]．以下に，クロロフィル $a$ とカロテノイドについて，マーカーバンドとそれから得られる情報について簡単に述べる．

#### 2.f.4.1　クロロフィル$a$

1620–1510 $cm^{-1}$ の領域には，クロリン環の C＝C 伸縮振動が現れる．これらの振動の振動数は中心 Mg への配位数の違いによって変化するため，配位数を決めるマーカーとなる[17]．6 配位構造においては，中心 Mg は環平面上に位置するが，5 配位構造では第 5 配位子によって中心 Mg が環平面から引き出された構造を取る．よって，5 配位構造において環はより縮んだ状態となり，C＝C 伸縮振動の振動数は 6 配位の場合よりも高く現れる．3 つの C＝C バンドが，それぞれ 1620–1590，1560–1540，1530–1510 $cm^{-1}$ の領域に現れ，そのうち，1600 $cm^{-1}$ 付近のバンドが最も明確に配位数依存性を示す．5 配位では 1620–1600 $cm^{-1}$，6 配位では 1600–1590 $cm^{-1}$ にバンドが現れる．

$13^1$ ケト C＝O はクロリン環の共役系に含まれているため，その伸縮振動は比較的強い強度を示す．1710–1640 $cm^{-1}$ の範囲にバンドが現れる[18,19]．水素結合相互作用がない場合には，1710–1680 $cm^{-1}$ に振動数を示す．その際，C＝O 基が存在する環境の誘電率が高いほど，低い振動数となる．水素結合を形成することにより，より低波数

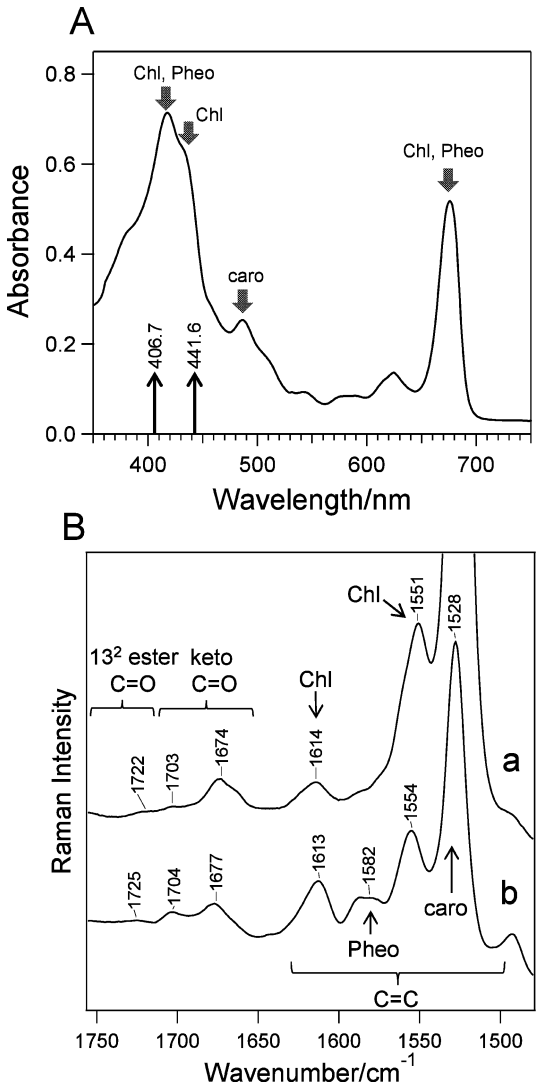



**図 3**：光化学系 II 反応中心蛋白質の電子吸収スペクトル（A）と共鳴ラマンスペクトル（B）．共鳴ラマンスペクトル（B）は，441.6 nm（a）及び 406.7 nm（b）励起によるもの．ラマン散乱測定の試料温度は 85 K．

側にシフトし，通常は，1680–1660 $cm^{-1}$ にバンドを示す．クロロフィル会合体において，ケト C＝O が別のクロロフィルの中心 Mg に直接配位すると，その伸縮振動は，1660–1650 $cm^{-1}$ に現れる．また，水との会合体において，C＝O‥HO(H)‥Mg のような架橋構造によって著しく強い水素結合が形成されると，1650–1640 $cm^{-1}$ まで振動数がシフトする．

$13^2$ エステル C＝O は，共役環の近傍に存在しているため，弱いラマンバンドを示すことがある．ケト C＝O よりも高い 1750–1710 $cm^{-1}$ の振動数領域にバンドを示すため，ケト C＝O との区別は容易である．水素結合の形成により，また，極性環境下おいて，より低波数側に振動数を持つことはケト C＝O と同じである．

他のクロロフィル類に関しても，多少の振動数の違いはあるものの，同様のマーカーバンドを用いてスペクトルを解釈することができる．

#### 2.f.4.2　カロテノイド

カロテノイドの共鳴ラマンスペクトルにおける顕著なバンドは，1600–1500 $cm^{-1}$ の C＝C 伸縮振動，1300–1100 $cm^{-1}$ に現れる CC（C＝C または C–C）伸縮/CH 面内変角振動，1000 $cm^{-1}$ 付近の Me 横揺れ振動，960 $cm^{-1}$ 付近に現れる C–H 面外変角振動のバンドである[20]．

共役二重結合の長さが長いカロテノイド程，C＝C 結合は低い振動数を持つ[21]．これにより，ラマンスペクトルからカロテノイドのポリエン鎖長をある程度推定することができる．しかし，溶媒や蛋白質環境の違いによっても C＝C 振動数が変化するので注意が必要である[22]．一般に，電子吸収バンドの波長と C＝C 伸縮振動数とは負の相関があることが知られている．

1200–1100 $cm^{-1}$ の CC 伸縮/CH 変角領域には複数のバンドが見られ，そのバンドパターンからシス/トランス異性体を区別することが可能である[6,23]．紅色光合成細菌の反応中心蛋白質に結合するカロテノイドが 15 シス型を持つことは，この CC/CH マーカーによって明らかとなり[24]，後に X 線結晶解析により確認された[25]．

960 $cm^{-1}$ 付近の対称 C-H 面外変角振動バンドの相対強度により，ポリエン鎖の捻じれ構造を知ることができる（図 4）[26,27]．ポリエン鎖が平面構造を取っている際には，この振動モードはほとんど強度を示さないが，二重結合に対して捻じれて対称性が崩れることにより，強いラマン強度を示すようになる．蛋白質に結合したときのカロテノイドの捻じれ構造は，光合成細菌の光捕集系におけるカロテノイドからバクテリオクロロフィルへの一重項励起エネルギー移動効率[27]や，植物の LHCII の非光化学消光[28]と関連付けて議論されている．

### 2.f.5　測定例：光化学系 II 反応中心蛋白質の共鳴ラマンスペクトル

光化学系 II の反応中心蛋白質には，コファクターとして 6 分子のクロロフィル *a* と 2 分子のフェオフィチン *a*，2 分子の *β*-カロテン，1 分子のチトクロム *b* 559 が含まれている．406.7 nm と 441.6 nm の励起光を用いて，クロロフィル及びフェオフィチンの Soret 帯を励起し，それらの共鳴ラマンスペクトルを測定する．

励起光として，He-Cd レーザー（Kimmon IK5651R-G）の 441.6 nm，及び $Kr^+$ レーザー（Innova 90-K）の 406.7 nm の発振線を用いる．

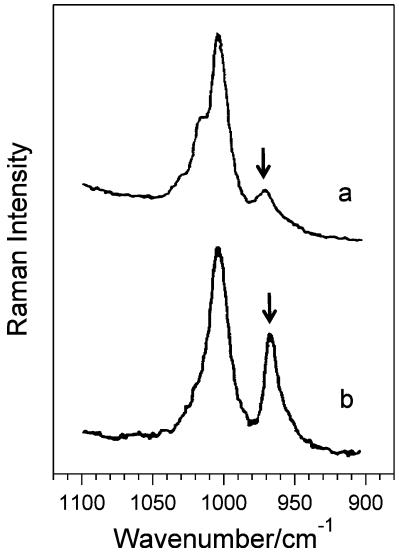



**図4**：紅色光合成細菌のクロマトフォアにおけるカロテノイドの共鳴ラマンスペクトル（CH面外変角振動領域）．(a) *Rhodobacter sphaeroides* (b) *Chromatium vinosum*．CH面外変角振動バンドを矢印で示す．*Rb. sphaeroides* の弱いCH面外変角振動バンド，及び *Ch. vinosum* の強いCH面外変角振動バンドは，それぞれ，ポリエン鎖の平面，及び捩れ構造を表す．

Hepes緩衝液（50 mM Hepes-NaOH，0.1% dodecyl maltoside pH 7.5）に懸濁した反応中心蛋白質（0.2 mg Chl/mL）を石英ガラスセル（図2 b(i)）に入れ，クライオスタット（Oxford DN1704）中で温度を85 Kにする．試料部において15 mWの強度のレーザー光をやや焦点をぼかして照射し(局所的な温度上昇を防ぐため)，レーザー光に対して直角方向の散乱光を集光する．ノッチフィルター（Kaiser Optical Systems, Inc.）でレイリー散乱を除去した後，シングル分光器に入射し，分光されたラマン散乱光をCCD検出器（Princeton Instruments, Inc., LN/CCD-1100PBUVAR）を用いて検出する．

図3のスペクトルが得られる[29]．クロロフィル *a* のSoret帯と一致する441.6 nmによる励起では，クロロフィルと *β*-カロテンのバンドが，またフェオフィチン *a* のSoret帯に近い406.7 nmの励起では，これらに加えて，フェオフィチンのバンドが観測される．

## 参考文献


1）濱口宏夫，平川暁子編，「ラマン分光法」，学会出版センター，1988．

2）M. Lutz, Advances in Infrared and Raman Spectroscopy, eds. R. J. H. Clark & R. E. Hester, John Wiley & Sons, New York, 1984, vol. 11, p.211.

3）B. Robert, *Biochim. Biophys. Acta* **1017** (1990) p.99.

4）M. Lutz & W. Mäntele, Chlorophylls, ed. H. Scheer, CRC Press, Boca Roton, 1991, p.855.

5）B. Robert, Biophysical Techniques in Photosynthesis, eds. J. Amesz & A. J. Hoff, Kluwer Academic Publishes, Dordrecht, Netherlands, 1996, p.161.

6）Y. Koyama & R. Fujii, The Photochemistry of Carotenoids, eds. H. A. Frank, A. J. Young & R. J. Cogdell, Kluwer Academic Publishes, Dordrecht, Netherlands, 1999, p.161.

7）B. Robert, The Photochemistry of Carotenoids, eds. H. A. Frank, A. J. Young & R. J. Cogdell, Kluwer Academic Publishes, Dordrecht, Netherlands, 1999, p.189.

8）V. Palaniappan, C. C. Schenck & D. F. Bocian, *J. Phys. Chem*. **99** (1995) p.17049.

9）D. D. Eads, C. Moser, M. E. Blackwood, C. Y. Lin, L. Dutton & T. G. Spiro, *Biopolymers* **57** (2000) p.64.

10）D. Frolov, A. Gall, M. Lutz & B. Robert, *J. Phys. Chem. A* **106** (2002) p.3605.

11）A. P. Shreve, N. J. Cherepy, S. Franzen, S. G. Boxer & R. A. Mathies, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*. **88** (1991) p. 11207.

12）K. Czarnecki, V. Chynwat, J. P. Erickson, H. A. Frank & D. F. Bocian, *J. Am. Chem. Soc*. **119** (1997) p.2594.

13）T. Noguchi, Y. Furukawa & M. Tasumi, *Spectrochim. Acta A* **47** (1991) p.1431.

14）T. A. Mattioli, A. Hoffmann, B. Robert, B. Schrader & M. Lutz, *Biochemistry* **30** (1991) p.4648.

15）J. S. Vrettos, D. H. Stewart, J. C. de Paula & G. W. Brudvig, *J. Phys. Chem. B* **103** (1999) p.6403.

16）A. Ivancich, K. Artz, J. C. Williams, J. P. Allen & T. A. Mattioli, *Biochemistry* **37** (1998) p.11812.

17）M. Fujiwara & M. Tasumi, *J. Phys. Chem*. **90** (1986) p. 250.

18）S. Krawczyk, *Biochim. Biophys. Acta* **976** (1989) p.140.

19）Y. Koyama, Y. Umemoto & A. Akamatsu, *J. Mol. Struct*. **146** (1986) p.273.

20）S. Saito & M. Tasumi, *J. Raman Spectrosc*. **14** (1983) p. 310.

21）L. Rimai, M. E. Heyde & D. Gill, *J. Am. Chem. Soc*. **95** (1973) p.4493.

22）R. J. H. Clark, N. R. D'Urso & P. F. Zagalsky, *J. Am. Chem. Soc*. **102** (1980) p.6693.

23）Y. Koyama, I. Takatsuka, M. Nakata & M. Tasumi, *J. Raman Spectrosc*. **19** (1988) p.37.

24）M. Lutz, I. Agalidis, G. Hervo, R. J. Cogdell & F. Reiss-Husson, *Biochim. Biophys. Acta* **503** (1978) p.287.

25）B. Arnoux, A. Ducruix, F. Reiss-Husson, M. Lutz, J. Norris, M. Schiffer, & C.-H. Chang, *FEBS Lett*. **258** (1989) p.47.

26）K. Iwata, H. Hayashi & M. Tasumi, *Biochim. Biophys. Acta* **810** (1985) p.269.

27) T. Noguchi, H. Hayashi & M. Tasumi, *Biochim. Biophys. Acta* **1017** (1990) p.280.
28) B. Robert, P. Horton, A. A. Pascal & A. V. Ruban, *Trends Plant Sci*. 9 (2004) p.385.
29) T. Noguchi, T. Tomo & Y. Inoue, *Biochemistry* **37** (1998) p.13614.

# 2．分光測定法
## g．葉群の分光反射と分光植生指数

中路　達郎[1)]

本節では，植物葉を対象とした分光特性研究の基礎的な知見と，野外における基本的な計測手法について解説し，葉内色素や光合成活性と関連した研究で用いられる評価指標（分光植生指標）について紹介する．

## Foliar spectral reflectance and spectral vegetation index

Tatsuro Nakaji

This section explains the fundamental knowledge of the spectrum characteristic research for an ecophysiological study of plant leaf, and introduces the basic measurement technique in the field and general indices (spectral vegetation index) related to the foliar pigment and photosynthesis.

### 2.g.1　はじめに

すべての物質は，電磁波を反射，透過，吸収する性質を持ち，その性質は対象の物質に固有の波長特性を示すことから，分光特性と呼ばれる[1,2)]（図1）．電磁波は波長の短いものから，γ線，X線，紫外線，可視光線，赤外線，電波と分類される．植物の分光計測研究では，おもに可視（400～700 nm），近赤外（700～1100 nm），短波長赤外（1100～2500 nm）の波長帯が扱われ[注1]，原子レベルでみると，これらの波長帯における分光特性は，原子の外殻電子の励起や分子振動，格子振動などの内部状態を反映している（図1）．

葉のスケールにまで拡大して，この分光特性を考えてみると，葉内にクロロフィルを多く含む緑葉で例えると理解しやすい．一般に緑葉では可視光のうち青（440 nm周辺）や赤（680 nm周辺）の波長はクロロフィルで吸収されて光化学系で励起エネルギーとして利用される．このため，太陽によって葉に照射される光のうち，これらの青と赤の波長の光はほとんど反射あるいは透過しない．その一方で，緑色の波長（550 nm周辺）の光はほとんどクロロフィルに吸収されないため，この波長の光の大部分は反射や透過によって外部に出ていく．私たちが

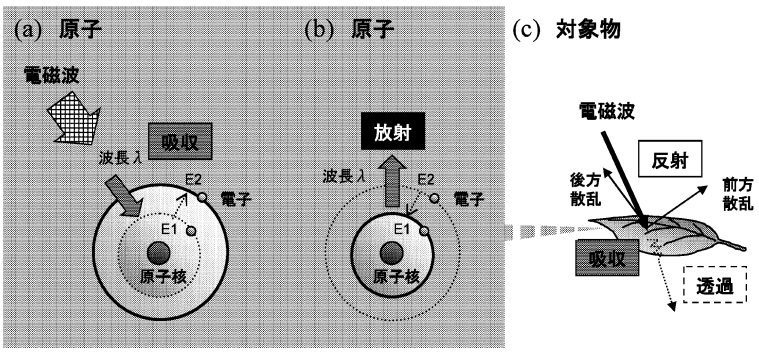



**図1**：分光特性の概念図．原子レベルでは，(a)電磁波が物質中の原子に当たると，一部の特定波長λの電磁波は吸収され内部状態の変化を起こす．他の波長の電磁波は作用せず，外部に出ていく．内部状態の変化は物質や波長に固有であり，可視～赤外波長帯では，励起や分子振動，格子振動などが起きる．励起の場合，$E_2-E_1=hc/\lambda$（hプランク定数，c光速）で決定されるエネルギーが吸収されて，外郭電子軌道があがる．(b) 励起とは逆に電子軌道が下がる場合は電磁波が放射される．(c) 観測対象（葉）の境界面でみた場合，吸収されない電磁波は外部に散乱する．表面で起きる反射のうち，電磁波の射出方向に散乱する成分を後方散乱（backward scattering），入射光の進行方面に散乱するものを前方散乱（forward scattering）という．個葉の場合，葉内で吸収・散乱を繰り返してして裏側から抜けた電磁波が透過成分として観測される．

1）独立行政法人国立環境研究所
（現職：国立大学法人北海道大学）

[注1] 波長の呼称は研究領域によっても若干異なることがある．分析化学の分野では，近赤外と短波長赤外の双方を含めて近赤外と呼ぶ場合もある．

葉の表面を眺めた時や森の樹冠を見上げた時にそれらを緑色と認識できるのは，緑色の波長が多くを占めている可視域の反射光・透過光を知覚しているためである．

植物の葉を対象とした場合，色素をはじめとする葉内物質の吸収による反射光や透過光の減衰過程はLambert-Beerの法則に従っており，多くの事象は物理的に解釈することが可能である．例えば，私たちは〝緑が濃い葉〟＝〝クロロフィル濃度が濃い〟と経験的に知っているが，その濃さの客観的な評価までは肉眼では行うことは不可能である．この点，分光特性，ここでおもに扱う分光反射の計測では，葉における波長ごとの反射強度を正確な数値情報として取得し，波長ごとの強度や波長間のバランスを解析することで，色素をはじめとする葉の生理情報を非破壊かつ客観的に評価している．

このような非破壊計測の手法は，分析化学や植物生理学における比較的細かいスケールの対象から，航空機や人工衛星のセンサーを活用した地表面のリモートセンシングに至るまで，非常に多くの分野，さまざまな空間スケールで活用されている．本節では，植物の生理研究に関連した分光特性の研究事例を紹介し，次に，分光反射を中心に，地上における計測手法について概説する．そして最後に，分光反射情報をもとに算出される評価指標（分光植生指標）についていくつか実例を交えて紹介する．

## 2.g.2　葉の分光特性

図2aにポプラの緑葉（個葉）の可視～短波長赤外における分光特性を示す．波長ごとの反射や吸収，透過はそれぞれ分光反射率，分光吸収率および分光透過率と呼ばれるが，グラフに示したような波長に対する反射や吸収，透過の応答パターンは，それぞれ，反射スペクトル，吸収スペクトル，透過スペクトルとも呼ばれる．このようなスペクトルの計測や，それに対する植物種や環境要因の影響を調査した歴史は古く，玖村・石井[3]は1800年代後半からの数多くの報告を取りまとめている[3]．それらを参考に従来の報告を見渡すと，多くの緑葉では，図2aに示したようなスペクトルを示すことが知られている．すなわち，反射率を例にとると，可視域では500 nmあたりまではカロテノイドやクロロフィルによる吸収のために5％程度の低い反射率でほぼ安定し，550 nm近辺を中心に15%程度の反射のピークを示す（グリーンピークとも呼ばれる）．このピークは葉内色素の波長選択性に依存しているため，白斑を持つ植物やアルビノ種の葉，紅葉が進んだ葉では観察されない[3,4,5]．反射率は，その後，670 nm近辺を境に780 nm近辺まで急勾配で増大し，その後1100 nmあたりまでおよそ50%で安定する（図2a）．短波長赤外においても反射率は比較的高い値を維持するが，水の吸収によって1450 nm，1940 nm近辺で反射率は大きく低下する．なお，図2aではあまり顕著ではないが，970 nm近辺にも水の吸収帯が存在する．リモートセンシングの分野では，これらの吸収帯近辺の反射率を用いて地表面や植生の水分量の評価手法が提案されている[6,7]．一方，1600～2300 nmの波長帯には，セルロースやリグニンなどの構造性炭水化物やデンプンや糖，タンパク質といった同化産物・生体物質の吸収帯も存在している．食品や土壌などを扱った分析化学分野では，対象物の短波長赤外の反射スペクトルを極めて詳細な波長分解能（$<10^{-1}$nm）で計測し，微分処理や多変量解析手法を活用することで，動植物の組織や土壌などに含まれる炭素や窒素化合物などの化学成分の推定を行っている[8,9,10]．野外において植物の計測に利用される短波長赤外の分光反射計測機材の多くは，室内分析で利用されるフーリエ変換赤外分光光度計などよりもその分解能は格段に粗い．しかし，航空機搭載のマルチバンドセンサー（波長分解能～数十nm）を使ったリモートセンシングにおいても，2000～2200 nmにおける反射率のひずみの程度から地表面の植物残さに関連したセルロース量の分布を推定する手法が提案されている[11]．現在も分光観測装

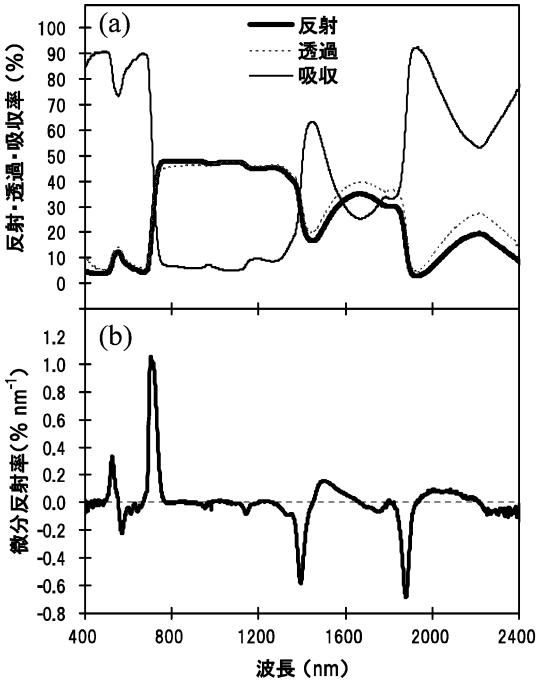



**図2**：（a）緑葉の反射・透過・吸収のスペクトルと（b）微分分光反射率．ポプラの個葉の表側に人工光（ハロゲン光）を照射し，センサーを近接させて分光特性を計測した．

置の波長分解能が進歩し続けていることもあり，今後，野外の植物葉の観測研究においても，葉内成分の定量などに短波長赤外の反射情報が注目される日が来るかもしれない．

ここで，波長に対する分光反射率の変動を解析する際の一技法である微分処理についても少し触れておく．図2 b に，ポプラ緑葉の一次微分反射スペクトルを示す．これは，波長方向に連続して計測された分光反射率をもとに，ある中心波長の前後の波長の反射率の値を用いてその増減を算出したものである．このような微分スペクトルは可視〜近赤外を中心に研究されており，反射率の変動が明確な色素吸収帯を中心にした報告は非常に多い．可視〜近赤外に着目すると，グリーンピークと赤色〜近赤外にかけたクロロフィル吸収帯に比較的大きなピークを得ることができる．特に 710 nm 近辺のピークはレッドエッジと呼ばれ，そのピーク高さはクロロフィル濃度と高い相関にあり，ピーク波長は色素のフェノロジーと関連して変動することも知られている[5,12,13]．気温などの環境要因を変化させながら，人工光チャンバー内でカエデの葉群の分光反射計測を行った Zalco-Tejada et al.[14] は，レッドエッジ周辺 690–710 nm の間にクロロフィル蛍光に関連する 2 つの微分ピークが検出されることに着目し，二つのピークの明瞭さが定常状態のクロロフィル蛍光特性の温度ストレス応答と関連があることを報告している．また，野外でも，航空機搭載型の分光画像情報から得られる微分反射スペクトルをもとにした指標でクロロフィル蛍光の強度（Ft）や蛍光ベースの量子収率（$\Delta F/Fm'$）の評価が行われており[15]，個体スケールから群落スケールにおいても，微分反射スペクトル情報の解析が光合成研究にとって有効な情報となりつつある．

次に，葉のタイプや季節ごとの分光特性の応答についても簡単に紹介する．約 80 種類の植物で可視〜近赤外の植物の分光反射，吸収，透過といった分光特性を調査した例では，植物種間の差は約 10%程度と報告されている[3,16]．他方，熱帯の 25 種[17]，温帯 26 種[18] の植物の葉について陽葉と陰葉の分光特性を比較した研究では，植物種による多少の相違は認められるものの，陰葉と陽葉では明瞭な特性の違いが認められないことが報告されている．Knapp & Carter[18] は，考察の中で，この一因として，葉の成長パターン，形態や寿命などの違いが複雑に分光特性に影響し，明確な傾向を示さなかった可能性があると述べている．

葉齢や葉色，葉組織の発達，毛茸やワックスの有無，水分状態，葉の表裏など，非常に多くの生物的な要因が可視〜近赤外の反射スペクトルに影響することはよく知られている[3,5,19,20,21,22]．たとえば，葉の老化に伴うクロロフィルの分解はグリーンピークの右側の反射率を増大させ，カロテノイドの分解は左側の反射率を増大させる[3,5,22]（図 3）．また，老化によって組織が崩壊すると，表面の粗度や内部組織の空隙率，水分の状態が大きく変わり，近赤外における反射・散乱も強く影響を受ける．また，毛茸やワックスは葉の表面の反射率を全体的に高めることは古くから知られており，表面を実験的に洗浄したり毛を剃ると反射率は低下する[3,20,21]．多くの観測研究では葉の処理を行うわけにはいかないので，色素評価のための指標の開発研究では，このような表面反射の影響を軽減するために青（445 nm）や赤の波長帯の反射率を基準にした反射率の補正を行っている[5]．また，多くの広葉では，表側と裏側で柵状組織や海面状組織の配置が異なるため，光の内部散乱過程が異なり，一般に裏面の反射率のほうが表側よりも高いことも良く知られており[3,19]，群落内部における光の吸収，散乱を解釈する上でも貴重な知見を与えている．

このように，葉の分光特性には葉の生理生態的な特徴が反映するため，逆に，分光情報を用いることで，植物の状態を非破壊かつ迅速に計測，評価することが期待されている．個葉だけでなく，葉群（群落表面）においても葉自体がもつ反射や吸収の特徴は大きく変わらないので，観測手法は応用が可能と思われる．ただし，野外の群落表面の分光情報を扱うときには，植物側の生物要因だけでなく，周囲の光条件や枝や幹，土壌からの反射と

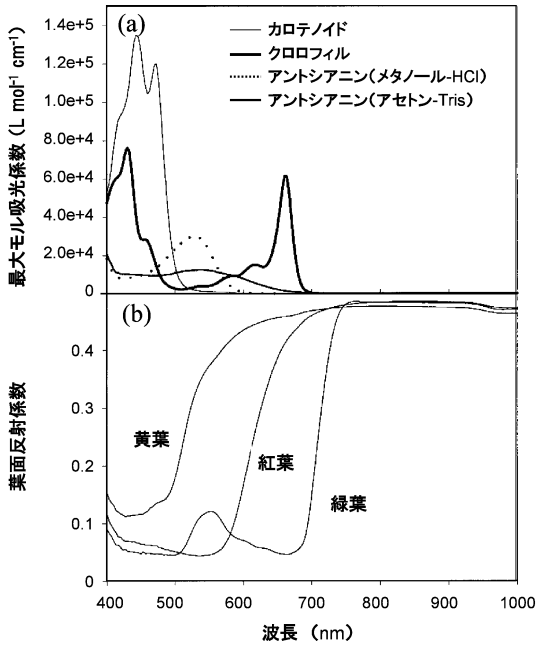



**図 3**：(a) 葉内色素の吸光特性と，(b) 季節の異なるモミジバフウの個葉の反射スペクトル[5]．

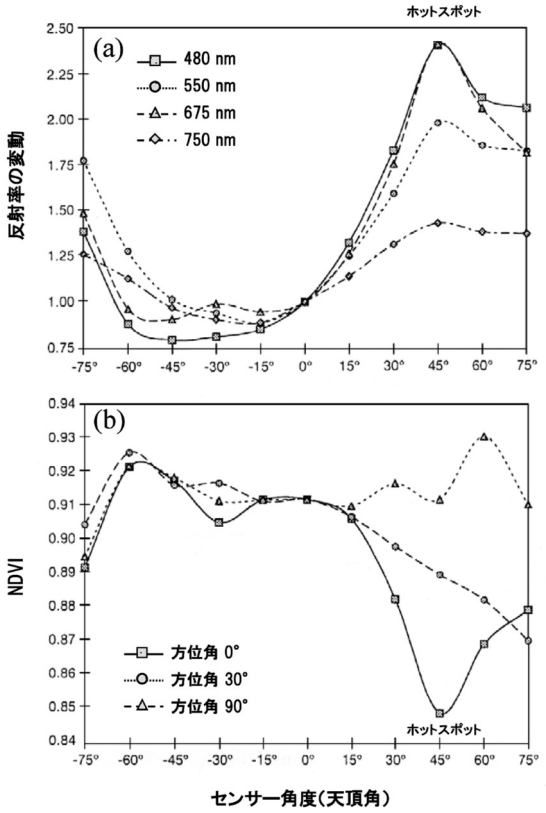



**図 4**：イネ科草本群落の(a)波長ごとの分光反射率および(b) NDVI に対するセンサー角度(天頂角)の影響[23]．地上 2 m の位置から計測したデータを示している．上の図は，太陽天頂角が 35°のときにセンサーの俯角を変えながら分光反射率を計測し，天頂から垂直に群落を観測したときの値を 1 とした相対値を波長ごとに示している．下の図では，センサーの天頂角を変動させた際の NDVI の変化をセンサーの方位角ごとに示している．上の図において横軸（センサー角度）が 35°のときと，下の図において横軸が 35°，方位角が 0 °のときは太陽を背に計測している状況になる．ホットスポットとは，太陽を背にした際にできる自身の影の周囲部分で反射率が高い．

いった物理的要因も影響することを念頭に置く必要もある．例えば，植物群落に分光放射計などを一方向から向けて反射を計測する際，センサーの角度や日射の角度が変化すると反射率も変動し，また，その変動パターンも波長によって異なることが知られている(図 4)．これは，光の入射角度や観測位置によって検出する反射成分（後方散乱，前方散乱）が異なること，波長ごとの光学厚さが波長によって異なることなどによる．この詳細な原理や対策については観測視野内の構成物の割合や，群落内の光の散乱・吸収プロセスを紐解く必要があり，今回は触れないが，少なくとも，野外の葉群や植物群落における分光反射を扱う際は，植物の生理生態条件を考慮するだけでなく，例えば観測角度や太陽角度を一定にするなど，非生物的要因の影響がなるべく小さくなるように観測条件にも考慮する必要がある．

## 2.g.3　分光反射の計測

分光反射率は入射光の放射に対する対象物からの反射の比として算出される（図 5）．このうち，入射光の計測に関しては，直接太陽光やランプなどの光源を見て計測する手法と，拡散板を使用して一度反射させた入射光の輝度を計測する場合の 2 種類がある．センサーの受光部に透過拡散板を装着している全天分光放射計などでは前者の手法で計測し，受光部に透過拡散板を用いない分光放射計や，分光輝度を画像で記録する分光カメラでは，拡散板を使用する後者の手法で計測する．

### (a) 分光放射計

最近の分光放射計の多くは分光系に回折格子を用いており，数 nm の高い波長分解能で数十〜数百バンドの連続した波長の情報（ハイパースペクトル）を計測できる．受光部の仕様によって，全方位型のものと測定視野が狭いファイバー型に大別される（図 6）．いずれも，内部で平行光にした導入光を回折格子に照射し，分光された光を内部のセンサーで検出し放射量として計算し出力する．分光放射計は視野角内の反射情報を平均化して計測する点が後述の分光カメラと大きく異なる点である．全方位型のものは，受光部に装着した透過拡散板を通した光を計測するため，視野角はほぼ 180 度であり，太陽位置による角度効果も補正されている．風雨に耐えられる機構のものが多く，野外の植物群落上の分光放射収支の長期計測に適している．市販品では，英光精機製 MS シリーズや PREDE 社の分光アルベドメーターなどがある．一方，受光部に光ファイバーを使った分光放射計（ASD 社　FieldSpec，スペクトラコープ社　Handy-Lambda2 など）は，視野角は狭いが，逆に，ある一定の対象範囲を特定して計測することができる．また，ファイバープローブを使った分光放射計では，波長分解能や価格帯などの選択の幅が広く，積分球やリーフクリップなどのアクセサリー類も充実しているため，分光反射率だけでなく，葉の分光透過や分光吸収も計測できる利点がある．

### (b) 分光カメラ

分光カメラには，任意の数波長の分光反射を計測するマルチバンドカメラと，多波長の反射画像を撮影できるハイパースペクトルカメラがある(図 7)．カメラによる分光反射観測では画像の中の任意の地点の解析をすることができるため，近接撮影による個葉の解析や，群落内の個体ごとの評価，土壌など構成物ごとの評価が可能に

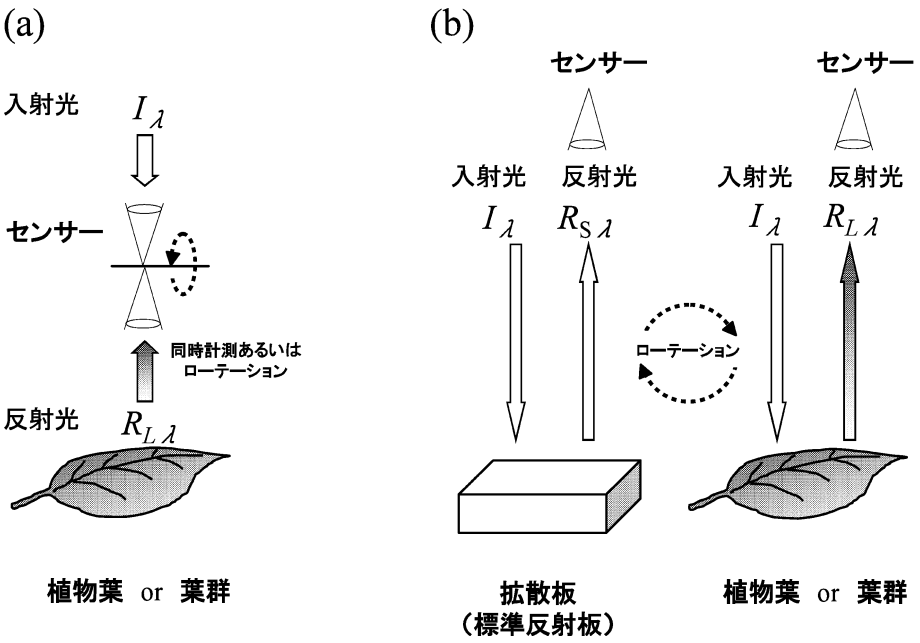



図5：分光反射の計測手法．(a) 対象の直上の入射と対象の反射の両成分を直接計測して両者の比率（$R_{L\lambda}/I_\lambda$）を求める手法と，(b) 既知の反射率を持つ拡散板をリファレンスにして入射光の強度を計測し，対象の反射輝度との比から反射係数（$R_{L\lambda}/R_{S\lambda}$）を計算して後で反射率に変換する手法がある．

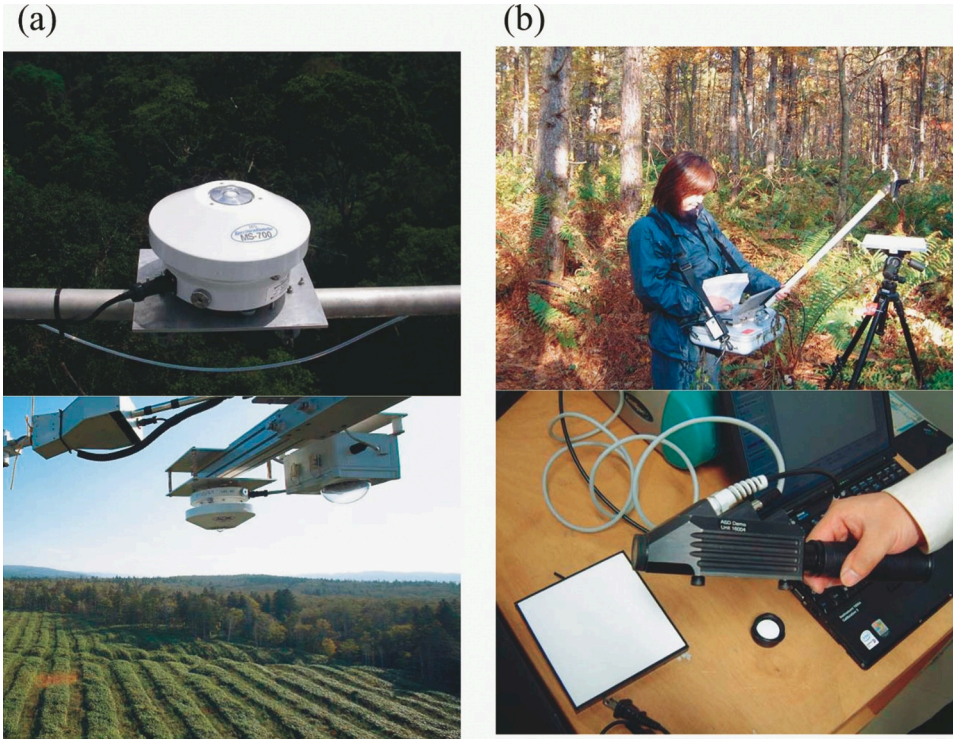



図6：分光放射計を使った観測風景．(a) 全天放射計では上向きと下向きの同時計測によってその日射と反射の比率を計算する．(b) ファイバータイプのものでは，任意の場所で計測したり，人工光源を内蔵したリーフクリップを使用した個葉の観測が可能である．

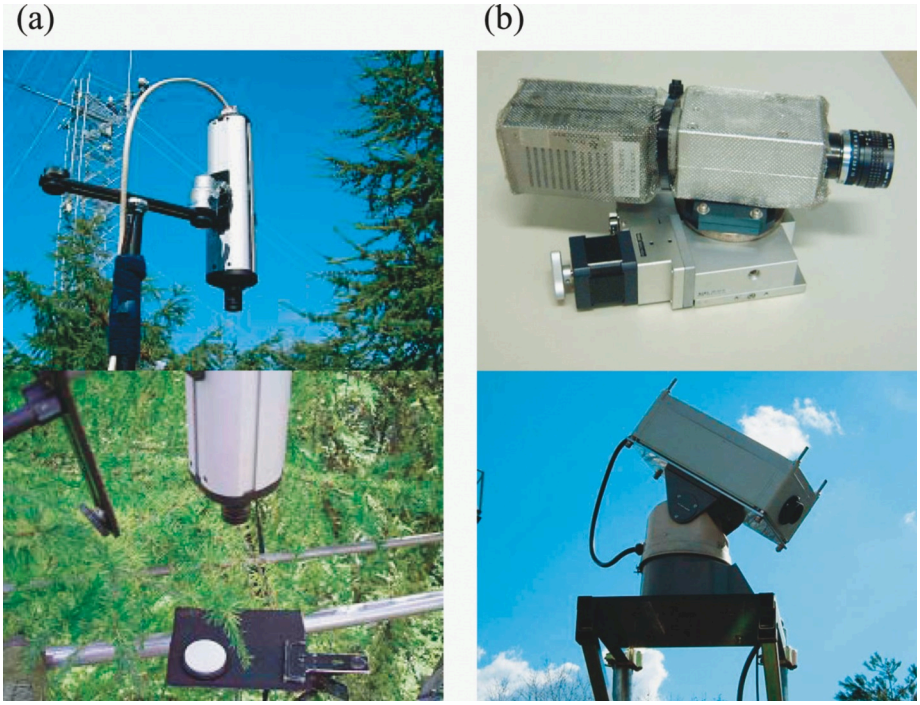



**図7**：分光カメラを使った観測風景．(a)マルチバンドカメラによる個葉の分光撮影実験．拡散板と対象の葉をひとつの画面に映しこみ，両者のピクセル比から反射率を計算する．後ろの黒い板には，低反射率の布が貼ってあり，対象の背面からの反射の影響を軽減している．(b)ハイパースペクトルカメラシステムの一例．カメラ本体に電動の回転ステージや雲台を装着してスキャンを行う．

なる．

マルチバンドカメラの分光方式は，任意の波長を透過するバンドパスフィルターを装着して透過した分光画像を撮影するものが主流であり，4バンドの市販分光カメラではPhotron社 MSI-4，Optical Insights社 Agro-Imagerなどがこれにあたる．また，私たちが通常使っているカラーデジタルカメラも青，緑，赤の3色の画像を撮影しており，ある意味では3バンドの分光カメラとも言える．カラーデジタルカメラ内部のCCDやCMOSは可視～近赤外において広く感度を持つが，素子表面に近赤外をカットするフィルターを貼り付けることで可視の3色の画像を撮影している．このため，近年では，その近赤外カットフィルターの代わりに青色波長のカットフィルターを装着することで緑，赤，近赤外域に感度を持たせた3バンドのマルチスペクトルカメラを作り研究する例もあり，Tetracam社のADC3のような製品も市販されている．ハイパースペクトルカメラでは，分光方式に回折格子，液晶チューナブルフィルター，音響チューナブルフィルターなどが用いられているが，回折格子を用いるものが多い（Specim社 ImSpectorシリーズ，Headwall Photonics社 Hyperspecシリーズなど）．回折格子を用いたカメラでは，レンズと分光系の間には幅が数～数十ミクロンのスリットが入っており，スリットを通して入射した線上の画像を分光して撮影する．このため，コピー機のラインスキャンのように，センサー部位を動かしながら高速で連続スキャンし，後でそれらの画像を結合させることで二次元情報として分光画像を解析する．

ファイバープローブを使った分光放射計や分光カメラによる観測では，反射標準となる拡散板を用いる．拡散板には，一般に$BaSO_4$を圧縮して固めたものや，テフロン樹脂製のプレート（Labsphere社 Spectralonや SphereOptics社 Zenithなど）が利用される．EVA（エチレンビニルアセテート）樹脂や発泡スチロールの板などの安価な素材を二次標準として使用することも可能だが，表面が鏡面になっていたり，粗すぎたりすると反射率に方向性が強く出たりてしてしまうので，あらかじめ分光反射値の検証が必要である．

## 2.g.4　分光植生指標

前述のように，分光反射率や微分反射率は，特定の波長領域に葉の光合成機能に関する色素や水分，構造などの生理生態情報を反映している．そのため，これらを活用した多くの指標，いわゆる分光植生指標（Spectral

**表1**：植生群落や個葉において利用される分光植生指標．$R$，$D$ はそれぞれ分光反射率，一次微分反射率を示し，その後ろの英字および数値は使用される波長帯，波長を示す（NIR：任意の近赤外波長，VIS：任意の可視波長，RED：680 nm 近辺の赤色波長帯）．波長は使用するセンサーの性能や対象植物などで変わる場合もある．

| 指標[a] | 計算式 | 評価対象[b] | 特徴 | 文献 |
|---|---|---|---|---|
| SR | $R_{NIR}/R_{VIS}$，$R_{RED}/R_{BLUE}$など | 群落の greenness，色素など | 2波長の反射率の比率を計算したもので，組み合わせは非常に多い．800 nm と 680 nm を組み合わせた $SR_{680}$ や 750 nm と 705 nm を使った $SR_{705}$ はクロロフィル濃度の評価にも利用されている．計算式の特性から，高輝度の情報や陰影の強い場合などに値の振れ幅が大きくなる特徴をもつ． | 25 ほか |
| NDVI | $(R_{NIR}-R_{RED})/(R_{NIR}+R_{RED})$ | 群落の greenness，FAPAR | 最も古くから利用される．2波長の反射率の差分を正規化した指標の総称で PRI や CI などもこの類に入るが，NDVI と呼ばれる指標の多くは，赤色域と近赤外を利用している．緑色域を使った Green NDVI などもある．一般にこの NDVI は，LAI が2を超えると飽和し，LAI との関係が非線形になる． | 26, 27ほか |
| GEMI | $\eta(1-0.25\times\eta)-(R_{VIS}-0.125)/(1-R_{VIS})$，$\eta=(2\times(R_{NIR}^2-R_{VIS}^2)-1.5\times R_{NIR}+0.5\times R_{VIS})/(R_{NIR}+R_{VIS}+0.5)$ | 群落の greenness | NDVI に対する土壌表面の高輝度反射の影響を抑え，大気成分の影響を軽減させるために開発された指標． | 28 |
| SAVI | $((R_{NIR}-R_{RED})/(R_{NIR}+R_{RED}+L))\times(1+L)$ | 群落の greenness，FAPAR | 土壌表面の高輝度反射の影響を補正した指標．係数 L は 0～1 の値をとり，0.5 で利用される．土壌や植生タイプが異なる時の安定性に課題がある．他にも MSAVI2，TSAVI，OPVI など多くの補正指標がある． | 29，30 |
| EVI | $((R_{NIR}-R_{RED})/(R_{NIR}+C_1\times R_{RED}-C_2\times R_{BLUE}+L))\times G$ | 群落の greenness，FAPAR，光合成量 | 青の反射情報を加えてエアロゾルによる影響を軽減し，非線形補正係数（L）も加えることで植生情報に対して飽和しにくい利点を持つ．$C_1$，$C_2$ はエアロゾル抵抗係数，G は出力係数．一般に L＝1，$C_1$＝6，$C_2$＝7.5，G＝2.5 で計算される．最近では，NDVI に代わって光合成ポテンシャルの評価に使われるようになった． | 31，32 |
| PVI | $(R_{NIR}-aR_{VIS}+b)/(a_2+1)_{0.5}$ | 群落の greenness | 可視と近赤外を2軸に取った散布図における土壌反射率の分布を直線で定義し，解析対象の分光情報がその直線からどれだけ離れているかユークリッド距離を算出，指標化したもの．衛星などの画像解析でよく利用される．$a$，$b$ は土壌の基準線を定義する変数． | 33 |
| PRI | $(R_{531}-R_{570})/(R_{531}+R_{570})$ | 葉内キサントフィルサイクル，光化学系II活性，光利用効率，カロテノイド／クロロフィル比 | 光強度に応じたキサントフィルサイクルの色素組成を検出する指標．光化学系IIの励起状態や，光合成速度における光利用効率（単位光あたりの $CO_2$ 固定効率）の日内変化を間接的に評価する．また，グリーンピークのスロープの反射率を使うためカロテノイド，クロロフィルのバランスも反映する． | 34 |
| SIPI | $(R_{800}-R_{445})/(R_{800}+R_{680})$ | カロテノイド／クロロフィル比 | カロテノイドとクロロフィルの吸収波長の違いを考慮して半経験的に開発された指標．葉表面組織や葉肉細胞の影響が軽減されている． | 35 |
| PSRI | $(R_{680}-R_{500})/R_{750}$ | カロテノイド／クロロフィル比 | カロテノイドとクロロフィルの吸収波長の違いを考慮して半経験的に開発された指標．両色素の比率が葉の老化や果実の熟成に関連することからこの指標名になっている． | 22 |
| CI | $(R_{750}-R_{705})/(R_{750}+R_{705})$ | クロロフィル濃度 | 750 nm と 705 nm を使った NDVI． | 36 |
| $mSR_{705}$ | $(R_{750}-R_{445})/(R_{705}-R_{445})$ | クロロフィル濃度 | 750 nm と 705 nm を使った SR に，445 nm をベースにした補正を施した指標． | 5 |
| $mND_{705}$ | $(R_{750}-R_{705})/(R_{750}+R_{705}-2\times R_{445})$ | クロロフィル濃度 | 750 nm と 705 nm を使った CI に，445 nm をベースにした補正を施した指標．Datt（1999）は 680 nm を補正に使ったが，Sims&Gamon[4] によって改良された． | 5 |
| CCI | $D_{720}/D_{700}$ | クロロフィル濃度 | クロロフィル濃度と関連が強いレッドエッジ周辺の 720 nm と 700 nm の微分反射率の傾きを指標化したもの．微分を扱うため，高い SN，波長分解能が要求される． | 37 |
| WI | $R_{970}/R_{900}$ | 水分 | 近赤外における水の吸収帯の深さを指標化したもの．ある程度の乾燥ストレスがかかった植物葉において効果が認められる． | 6 |
| NDWI | $(R_{NIR}-R_{SWIR})/(R_{NIR}+R_{SWIR})$ | 水分 | 短波長赤外における水吸収帯の深さを近赤外のプラトー領域で評価した指標[7]．SPOT-VGT を使った例では，植生の春先のフェノロジーの評価に有効であると報告されている[38]．また，この指標と NDVI を2軸にして広域の地点の散布図を作成し，対象とする地点と同じ NDVI で取りえる最小 NDWI と対象地点の NDWI のユークリッド距離を乾燥の指標（VDI：Vegetation Dryness Index）と定義して森林火災ポテンシャルを評価した研究もある[39]． | 7，38，39 |
| CAI | $0.5\times(R_{2000}+R_{2200})-R_{2100}$ | セルロース | セルロースの吸収帯（2100 nm 近辺）における反射率のひずみを両側の反射率を基準に指標化したもの．植物残さの検出などで有効性が示されている． | 11 |

a　略称　SR: Simple Ratio, NDVI: Normalized Difference Vegetation Index, GEMI: Global Environment Monitoring Index, SAVI: Soil Adjusted Vegetation Index, EVI: Enhanced Vegetation Index, PVI: Perpendicular Vegetation Index, PRI: Photochemical Reflectance Index, SIPI: Structure Insensitive Pigment Index, PSRI: Plant Senescing Reflectance Index, CI: Chlorophyll Index, mSR: Modified Simple Ratio, mND: Modified Normalized Diffrence, CCI: Canopy Chlorophyll Index, WI: Water Index, NDWI: Normalized Difference Water Index, CAI: Cellulose Absorption Index.

b　FAPAR（Fraction of Absorbed Photosynthetically Active Radiation）は光合成有効放射量が群落内で吸収される比率を示す．Greenness の示すものとしては，土地被服分類を行う際の緑被率や，緑葉の葉面積指数（LAI, Leaf Area Index）などが指標をもとに評価される．

Vegetation Index）が開発されている．表１に代表的な分光植生指標を示す．反射率の値をそのまま用いるケースや，反射と透過の比率を利用する例などもあるが，ここで紹介した指標の多くは，植物の情報に感度を持つ波長の分光反射率の変動を対象波長と基準波長の正規化差分や比率から検出している．

NDVI（Normalized Difference Vegetation Index）[26]は，最も古くから利用されてきた指標であり，クロロフィルの反射領域と構造に関連した近赤外の反射率の正規化差分として算出される．人工衛星による広い分光幅の反射データから計算できることもあり，広域の群落スケールにおける光合成有効放射（FAPAR, Fraction of Absorbed Photosynthetically Active Radiation）や葉面積指数（LAI, Leaf Area Index）の推定に広く利用されてきたが，LAI がおよそ 2 を超えると飽和するなどの欠点もあるため，最近では EVI（Enhanced Vegetation Index）[31,32]のほうが良く利用される．EVI は群落における日積算の GPP（総一次生産）の間に正の関係を示すため，衛星データを用いた全球の炭素吸収量マッピングなどに広く利用されており，地域ごとの安定性の検証や気象条件が変動したときの対応などが今後の課題となっている．

一方，生理情報との関連があり，個葉においても研究利用が期待される指標としては，クロロフィル濃度を可視―近赤外の反射率から推定する $mND_{705}$（Modified Normalized Deference）[5]や微分スペクトルを利用した CCI（Canopy Chlorophyll Index）[36]といった色素系の指標，キサントフィルサイクルの光応答を反映し光化学系 II の活性とも関連のある PRI（Photochemical Reflectance Index）[34]などであろう．PRI は，グリーンピークの両側の反射率の正規化差分を使っているので，長期的な変動にはクロロフィルとカロテノイドの比率が影響するが[5,40]，キサントフィルサイクルの色素であるビオラキサンチンが強光時にアンテラキサンチンやゼアキサンチンに移行する際に生じる 531 nm 近辺の反射率低下も検出するため，キサントフィルサイクルのエポキシ化や，間接的な光化学系 II の指標として提案されている[34,40,41]．また，光合成において単位光あたりの炭素固定効率（LUE, Light Use Efficiency，光 ── 光合成曲線の初期勾配 $\phi$ とは異なる）と PRI の間の正の相関関係も個葉から群落まで報告されている[42,43,44]．日本のカラマツの針葉における観測研究でも，光化学系 II 活性やエポキシ化率，LUE の日変動や[39,45]，群落スケールの LUE の季節変動[46]と PRI の間には正の相関が得られている（図 8）．群落においては，衛星データを用いた LUE の推定研究も進んでおり[47]，PRI も広域の植生観測の観測指標としての実用化が検討されている．しかし，これまでの個葉や群落スケールでの観測研究では，植生タイプごとの感度の違い[43,46]や土壌の影響による感度低下[36]も指摘されており，そのメカニズムの解明とそれに即した実用化に研究の余地が残っている．これまでの指標の多くがそうであるように，PRI も $CO_2$ の吸収などの光合成機能を直接計測しているものではなく，光学的に検出可能な光合成関連物質（色素など）の組成の変化から光合成機能を間接的に評価している．このため，今後は，光合成の各種モデルにおけるパラメータの外挿として利用や，植物のストレス応答やフェノロジーの検出といった定性的な観点からの利用性を探るのも，分光観測の活用手法として重要になると思われる．

## 引用文献


1）日本リモートセンシング研究会編，「図解リモートセンシング」，社団法人　日本測量協会，1992，P.308．
2）G. Asrar, Theory and Applications of Optical Remote Sens., Toronto, John Wiley & Sons, 1989, P.734.
3）玖村敦彦，石井龍一，葉における光の反射・吸収・透過，「作物の光合成と物質生産」，戸苅義次監修，養賢堂，1971，P.29．
4）E. Baldini, O. Facini, F. Nerozzi, F. Rossi & A. Rotondi, Trees, **12** (1997) P.73.
5）D. A. Sims & J. A. Gamon, Remote Sens. Environ., **81** (2002) P.337.
6）J. Peñuelas, J. Pinol, R. Ogaya & I. Filella, Int. J. Remote Sens. 18 (1997) P.2869.
7）B.-C. Gao, Remote Sens. Environ. **58** (1996) P.257.
8）D. Gillon, C. Houssard & R. Joffre, Oecologia, **118** (1999) P.173.
9）H. W. Siesler, Y. Ozaki, S. Kawata & H. M. Heise, Near-infrared spectroscopy, principles, instruments, applications, Weinheim, Wiley, 2002, P.269.
10）A. Stevens, B. Van Wesemael, G. Vandenschrick, S. Toure & B. Tychon, Soil Sci. Soc. Am. J. **70** (2006) P.844.
11）P. L. Nagler, Y. Inoue, E. P. Glenn, A. L. Russ, & C. S. T. Daughtry, Remote Sens. Environ. **87** (2003) p.310.
12）J. R. Miller, J. Wu, M. G. Boyer, M. Belanger & E. W. Hare, Int. J. Remote. Sens. **12** (1991) P.1509.
13）A. A. Gitelson, M. N. Merzlyak & H. K. Lichtenthaler, J. Plant Physiol. **148** (1996) P.501.
14）P. J. Zalco-Tejada, J C. Pushnik, S. Dobrowski & S. L. Ustin, Remote Sens. Environ. **84** (2003) P.283.
15）P. J. Zalco-Tejada, J R. Miller, G. H. Mohammed, T. L. Noland & P. H. Sampson, Remote Sens. Environ. **74** (2000) P.596.

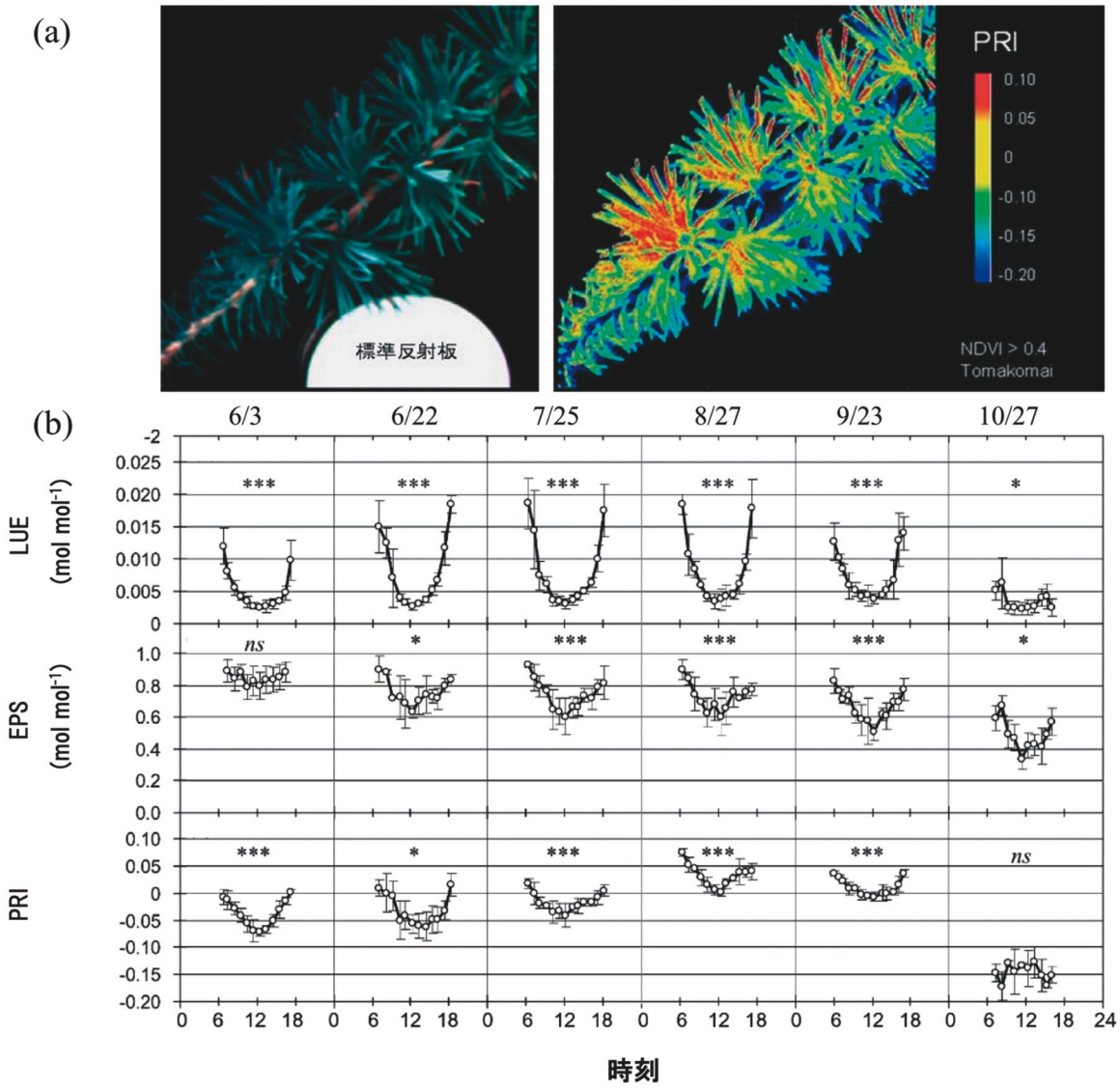



**図8**：分光カメラを使ったPRIの観測結果．(a) マルチバンドカメラによるカラマツ針葉の撮影画像．便宜的にNDVIを閾値にしてバックグラウンドのデータを削除して表示させてある．(b) 画像を撮影した針葉における純光合成速度の光利用効率（LUE＝純光合成速度/PAR），エポキシ化率（EPS＝$(V+0.5A)/(V+A+Z)$，$V$：ビオラキサンチン濃度，$A$：アンテラキサンチン濃度，$Z$：ゼアキサンチン濃度）およびPRIの季節ごとの経時変化．快晴日におけるデータを示してある．LUEやEPSは日中に低下し，PRIは緑葉時期（6/3〜9/23）は日中に同様に低下する．緑葉時期は，PRIは他のパラメータと正の相関を示すが，10月の黄葉では正の相関を示さなかった（Nakaji *et al*.[39] の一部を抜粋）．


16) A. F. Kleschnin & J. A. Shul'gin, Dokl. Acad. Sci. USSR. **125**, (1959) P.108.
17) D. W. Lee & R. Graham, Am. J. Bot. **73** (1986) P.1100.
18) A. K. Knapp & G. A. Carter, Am. J. Bot. **85** (1998) P. 940.
19) G. I. Pearman, Aust. J. Biol. Sci., **19** (1966) P.97.
20) R. J. Cameron, Aust. J. Bot. **88** (1970) P.275.
21) J. T. Woolley, Plant Physiol., **47** (1971) P.656.
22) M. N. Merzlyak, A. A. Gitelson, O. B. Chivkunova & V. Y. Rakitin, Physiol. Plant. **106** (1999) P.135.
23) S. R. Sandmeier & K. I. Itten, IEEE Trans. Geosci. Remote Sens. **37** (1999) P.978.
24) C. F. Jordan, Ecology **50** (1969) P.663.
25) C. J. Tucker, Remote Sens. Environ. 8 (1979) P.127.
26) J. A. Gamon, C. B. Field, M. L. Goulden, K. L. Griffin, A. E. Hartley, G. Joel, J. Peñuelas & R. Valentini, Ecol. Appl. **5** (1995) P.28.
27) M. M. Verstraete & B. Pinty, IEEE Trans. Geo. Remote Sens. **34** (1996) P.1254.
28) A. R. Huete, Remote Sens. Environ. **25** (1988) P.295.
29) X. Gao, A. R. Huete, W. Ni, T. Miura, Remote Sens. Environ. **74** (2000) P.609-620.
30) H. Q. Liu & A. R. Huete, IEEE Trans. Geosci. Remote Sens. **33** (1995) P.457.

31）A. R. Huete, K. Didan, T. Miura, E. P. Rodriguez, X. Gao & L. G. Ferreira, Remote Sens. Environ. **83**, (2002) P. 195.
32）A. J. Richardson & C. L. Wiegand, Photogram. Eng. Remote Sens. **43** (1977) P.1541.
33）J. A. Gamon, L. Serrano & J. S. Surfus, Oecologia **112** (1997) P.492.
34）J. Peñuelas, F. Baret & I. Filella Photosynthetica **31** (1995) P.221.
35）A. A. Gitelson & M. N. Merzlyak, J. Plant Physiol. **143** (1994) P.286.
36）D. A. Sims, H. Luo, S. Hastings, W. C. Oechel, A. F. Rahman & J. A. Gamon, Remote Sens. Environ. **103** (2006) P.289.
37）N. Delbart, L. Kergoat, T. L. Toan, J. Lhermitte & G. Picard, Remote Sens. Environ. **97** (2005) P.26.
38）M. Maki, M. Ishihara & M. Tamura, Remote Sens. Environ. **90** (2004) P.441.
39）T. Nakaji, H. Oguma & Y. Fujinuma, Int. J. Remote Sens. **27** (2006) P.493.
40）J. Peñuelas, F. Baret & I. Filella, Photosynthetica **31** (1995) P.221.
41）J. Peñuelas, J. Llusia, J. Pinol & I. Filella, Int. J. Remote Sens. **18** (1997) P.2863.
42）I. Filella, T. Amaro, J. L. Araus & J. Penuelas, Physiol. Plant. **96** (1996) P.211.
43）J. C. Nichol, J. Lloyd, O. Shibistova, A. Arneth, C. Roser, A. Knohl, S. Matsubara & J. Grace, Tellus **54** (2002) P.677.
44）I. B. Strachan, E. Pattey, J. B. Boisvert, Remote Sens. Environ. **80** (2002) P.213.
45）中路達郎，武田知己，向井譲，小池孝良，小熊宏之，藤沼康実，日林誌 **85**（2003）P.205.
46）T. Nakaji, R. Ide, K. Takagi, Y. Kosugi, S. Ohkubo, K. Nishida, N. Saigusa & H. Oguma, Agr. For. Meteorol. **148** (2008) P.776.
47）G. Drolet, K. F. Huemmrich, F. G. Hall, E. M. Middleton, T. A. Black, A. G. Barr, H. A. Margolis, Remote Sens. Environ. **98** (2005) P.212.

# 3．パルス変調蛍光
## a．クロロフィル蛍光と吸収による光合成測定

園池　公毅[1)]

クロロフィル蛍光はその起源となる光化学系の種類や量，そしてエネルギー移動を反映するため，光化学系の量比やステート遷移に関する情報をそこから得ることができる．また，室温での蛍光測定にパルス変調測定法を適用することにより，植物の光合成の状態を非破壊的に測定することができる．この場合，クロロフィル蛍光自体は光化学系IIから発光するが，電子伝達の相互作用を通して，系II以外の光合成の状態に関する情報を蛍光から得ることもできる．本稿では，クロロフィル蛍光測定の原理と，測定結果を定量化する方法，そして結果として得られたパラメーターの解釈の方法について解説し，さらにパルス変調法の吸収測定への応用についても触れる．

## Basics of the Measurements of Photosynthesis by Pulse Amplitude Modulation

Kintake Sonoike

Recently developed technique of pulse amplitude modulation (PAM) fluorescence measurement is a very effective method to characterize the various aspects of photosynthesis. Principles of the measurements and basic application to the photosynthesis research is summarized.

### 3.a.1　光合成測定としてのクロロフィル蛍光

#### 3.a.1.1　蛍光の一般論

蛍光とは，光を吸収して励起状態となった色素が元の基底状態に戻る際に，基底状態と励起状態の差に相当するエネルギーの一部を光の形で放出する現象である[1)]．照射した光の光子数（またはエネルギー）に対してどれだけの蛍光が放出されるかの比率を蛍光の量子（またはエネルギー）収率という．ある物質が一定の光量子束密度 $I_{abs}$ の光を吸収した時の蛍光の強さ F はその物質の蛍光の量子収率を ΦF とした時に

$$F = I_{abs} \cdot \Phi F$$

として表される．ΦF が一定とみなしうる時には F を測定することによって $I_{abs}$ を求めることが可能なので，蛍光色素 Cy3，Cy5 や蛍光タンパク質 GFP などを利用した蛍光測定においては，$I_{abs}$ が蛍光物質の量に比例すると仮定して，例えば mRNA の量やその他の物質の指標とする．一方，クロロフィル蛍光の測定においては，$I_{abs}$ を一定とみなし，F を測定することによってクロロフィルの ΦF の変化を見積もることにより，光合成系に関する情報を得ることになる．なお，文献の中において F（蛍光強度）と ΦF（蛍光収率）を区別していない場合もあるが，$I_{abs}$ が一定であるとの前提の下では F と ΦF の挙動は一致するため，解釈においては通常大きな問題とはならない．

#### 3.a.1.2　光合成色素の蛍光

有機溶媒中におけるクロロフィルの蛍光収率は室温で通常 0.3 程度である．しかし，植物の葉におけるクロロフィルの蛍光収率は 0.01–0.003 と極めて低い．この差は，クロロフィルが吸収したエネルギーが光合成に使われる場合には蛍光として放散されるエネルギーの割合が低下するとして解釈できる．クロロフィル蛍光の強さは温度依存性を示し，低温になると蛍光強度は増大する．室温では，光化学系 I の蛍光収率は光化学系II に比べて非常に小さくなり，特に蛍光のうち 690 nm 付近を主に検出している場合は，光化学系II の蛍光がそのほとんどを占める．

#### 3.a.1.3　低温蛍光スペクトル測定による光化学系量比の測定

室温では光化学系 I の蛍光は弱く，また二つの光化学系の蛍光の波長が近いため，両者を区別することは通常できない．一方，液体窒素温度（−196°C，絶対温度 77 K）まで冷却すると，光化学系 I のクロロフィルは 715–735 nm に蛍光発光を示すのに対して，光化学系II は 685 nm と 695 nm に蛍光発光を示し，これはコアアンテナに由来する（蛍光測定の章を参照）．光化学系 I の場合は，コアアンテナ単独では 720 nm に蛍光極大を示すが，LHCI

1）東京大学・新領域創成科学研究科・先端生命科学専攻

を結合した光化学系Ⅰでは735 nmに極大が見られる．LHCII自体の蛍光極大は680 nm付近であるが，光化学系IIのコアアンテナへの励起エネルギー移動は極めて効率的であるため，葉や細胞などにおいて光化学系IIと複合体を形成している時にはLHCIIの蛍光はほとんど検出されない．一方，紅藻やシアノバクテリアにおいては，クロロフィルの蛍光の他にフィコビリンの蛍光が観察される．LHCIIとは異なり，*in vivo*でもある程度の蛍光が見られ，特にクロロフィルへのエネルギー移動が阻害されるような条件では強い蛍光が観察される．液体窒素温度では，アロフィコシアニンの蛍光が685 nmに，フィコシアニンの蛍光が660 nm付近に観察されることが多い．

蛍光の収率は各複合体で異なるので蛍光の強さから光化学系量自体を見積もることはできないが，蛍光スペクトルの測定により2つの光化学系の相対的な比率を見積もることは可能となる．また，各光化学系からの蛍光発光の強さは，その光化学系にエネルギーを渡すアンテナのサイズに比例する．従って，ステート遷移のように，条件によってアンテナサイズが変化するような場合には，クロロフィル蛍光の強さに反映されることになる．これを利用して，例えばステート1からステート2への遷移が起こっているかどうかを推定することも可能である（次節参照）．

この際，試料のクロロフィル濃度が蛍光スペクトルに影響を与える場合があることに注意する必要がある．試料のクロロフィル濃度が高いと，クロロフィルから発光した蛍光が試料から外へ出る前に別のクロロフィルによって吸収される．これを自己吸収という．クロロフィルの赤色部の吸収バンドの波長は670–680 nm付近なので，その影響は，光化学系IIの685 nmの蛍光の場合に一番大きく，次が695 nmの蛍光になり，光化学系Ⅰの蛍光に対する影響は一番小さくなる．従って，クロロフィル濃度が高い試料では光化学系IIの蛍光が選択的に吸収され，見かけ上，光化学系IIが少なくなっているように見える．クロロフィル濃度が異なる試料間でスペクトルを厳密に比較することはできないと考えた方がよい．液体試料の場合は，5 $\mu$g/ml以下のクロロフィル濃度にするとほぼクロロフィルの自己吸収の影響を避けることができる．クロロフィル蛍光スペクトルは，植物の葉でもそのまま測定できる点が利点であるが，葉の場合は局所的なクロロフィル濃度が極めて高いので，スペクトルを見ると必ず光化学系Ⅰのピークが相対的に非常に大きくなっている．従って，クロロフィル濃度が異なる葉の間でスペクトルを比較しても意味がないという点に注意する必要がある．

一般的な蛍光光度計でも，液体窒素温度での測定を可能にするユニットを増設することにより測定が可能になるが，機種によっては特注による改造が必要となる．試料を冷やす方法としては，試料セル自体を液体窒素に浸す場合と，試料セルの金属部分を一部液体窒素に浸して熱伝導によって温度を下げる場合の二通りがある．前者の場合は，測定光の光路が液体窒素の中を通るため，特に熱の絶縁が不完全な場合，液体窒素の中の泡が測定を妨害する場合があることに注意する．また，後者の場合は，冷えた試料セルが空中にでているため，場合によっては霜が付いて測定を妨害する場合があるので注意する．蛍光光度計では，測定光の光路と検出する蛍光の光路が直角になっている場合が多い．液体窒素温度による測定では試料が凍結するため試料の散乱が大きいので，試料セルは1 mm程度の薄いものを用いる．その際，試料セルの向きがちょうど測定光と45度の角度に配置されると測定光の反射光が検出器に入ってしまうので，どちらかに少しずらしておくことが望ましい．

光化学系の量比を測定する場合，試料は，5分程度の暗順応をしてから暗所で凍結するとステート遷移の影響が避けられ，再現性のある結果が得られる．測定波長は650 nmから770 nm程度まででよい．励起光は430 nm付近の青い光を用い，その場合スリット幅は最大で構わない．蛍光を検出する側のスリット幅は2 nm程度とすることが多い．陸上植物の場合は650 nmにおいては蛍光は通常発光しないので，この波長における信号の強さを蛍光のゼロ点としてよいが，紅藻やシアノバクテリアといったフィコビリンを含む生物では，きちんとバックグラウンドを測定する必要がある．水やバッファーによるバックグラウンドの測定により，励起光の反射などに起因する迷光などのアーティファクトの存在も確認することができる．ただし，試料が存在する条件では試料の吸収によって迷光の大きさは減少するので，バックグラウンドを単に引き算することによってアーティファクトを補正することが困難な場合もある．

光化学系の量比の指標としては685 nmの蛍光強度F 685もしくは695 nmの蛍光強度F 695と735 nm（実際には極大波長を取るのでシアノバクテリアなどでは725 nm）の蛍光強度F 735（F 725）の比，つまりF 735/F 685もしくはF 735/F 695を用いる．高等植物の場合，F 695に比べてF 685の方が条件による変動が少ないため，F 735/F 685を光化学系Ⅰ／光化学系IIの比の指標として用いる場合が多い．シアノバクテリアの場合，685 nmの蛍光は，系IIのクロロフィル蛍光の他にフィコビ

リンの蛍光の寄与もあるので，F 725/F 695 を指標とする例が多い．いずれにせよ，これらの値は指標に過ぎず，光化学系 I ／光化学系 II のモル比を示すわけではないことに注意する必要がある．

### 3.a.1.4　低温蛍光スペクトルによるステート遷移の測定

藻類とシアノバクテリアにおいては，ステート遷移が光合成に与える影響が大きいため，液体窒素温度でクロロフィル蛍光スペクトルを測定することによって容易にステート遷移の大きさを見積もることができる．シアノバクテリアは原核生物であるため，細胞内の光合成電子伝達系が呼吸鎖と一部の電子伝達成分を共有している．また，藻類でも，大きな葉緑体呼吸が見られる．従って，これらでは，高等植物とは異なり，暗順応した細胞においてプラストキノンプールは還元されてステート 2 の状態になっている．一方で，光化学系 II の阻害剤である DCMU を加えて光を照射すれば，光化学系 I の働きでプラストキノンプールは酸化されてステート 1 の状態になる．このようにして，細胞を簡単にステート 1 もしくはステート 2 の状態にすることができるので，5−15 分暗順応した細胞での蛍光スペクトルと DCMU を終濃度 10 $\mu$M 加え，光を 1 分ほど照射してそのまま液体窒素で凍らせて測定した蛍光スペクトルを比較すれば，ステート遷移を観察することができる．ステート 2 では光化学系 II のアンテナサイズが小さくなっているので，相対的に光化学系 II の蛍光は弱くなり，逆にステート 1 では光化学系 I の蛍光が弱くなるはずである．２つの状態でクロロフィル蛍光スペクトルに差があればステート遷移が起こっている，差がなければステート遷移に異常がある，と結論できる．陸上植物でも理論的には同様な実験が可能であるが，ステート遷移の蛍光に対する寄与が小さいので，２つのステートごとに別々の測定が必要な本方法では試料間の誤差が生じやすく，正確な測定が難しい．従って陸上植物の場合は，後述するパルス変調などによる蛍光の連続測定中に励起光を変えることにより蛍光強度の変化を検出することによってステート遷移に関する情報を得る場合が多い．

### 3.a.1.5　クロロフィル蛍光の誘導期現象

暗所においた光合成細胞に一定の連続光を照射すると，その蛍光強度が図 1 のように複雑に変化することは 19 世紀から知られていた[2]．このような蛍光強度変化をクロロフィル蛍光の誘導期現象という．実際には，吸収された光のエネルギーは，光合成に使われ，また蛍光として際放出されるだけでなく，さまざまな反応を経て熱になる分も存在する．吸収された光のエネルギーがどのように変化するかは，さまざまな反応の競争の結果決まると考えられる．それぞれの反応の収率を足し合わせたものは 1 になると考えられるので，ある反応の変化は他の反応の相補的な変化を伴う．光化学反応に伴って蛍光の収率が減少することを光化学消光（photochemical quenching），熱放散の増大に伴って蛍光の収率が減少することを非光化学消光（nonphotochemical quenching）という．実際に，クロロフィル蛍光の誘導期現象において，蛍光収率と光合成の速度の間に負の相関があることは古くから指摘されていた．蛍光の収率自体は，当然のことながら熱になる反応の速度によっても左右されることから，蛍光の誘導期現象が，そのまま光合成速度の変化を示すわけではない．しかしながら，暗所においた葉に光合成が飽和するような光をあてて，１秒程度までの短い時間のクロロフィル蛍光強度の変化を見る場合には，その変化は主に光化学消光によると考えられる．そして，この蛍光挙動は暗所で酸化されていた光化学系 II の電子受容体である $Q_A$ が光照射によって還元される過程によってほぼ説明できる．すなわち，最初に $Q_A$ が完全酸化されている状態 O（全ての反応中心が open である状態）では蛍光強度は最低（$F_O$）であり，$Q_A$ が還元されていくに連れて（close した反応中心が増えるに連れて）蛍光強度は増加しやがて P で極大値（$F_P$）に達する．この P で，$Q_A$ が完全還元されている場合（全ての反応中心が close である場合）は，この $F_P$ は蛍光の最大値 Fm に等しくなる．蛍光の値は $F_P$ 以後も，さらに電子伝達や炭酸固定の活性状態の変化により S-$M_1$-$M_2$-T と複雑な変化を示す場合が多い（図 1）．この変化がどの程度の時間で引き起こされるかは，照射した光の明るさに依存することもあり，一定ではない．また，研究グループによって，O，P，S，M，T といった名前の付け方も様々である．

比較的強い励起光を用い，サブミリ秒からの短い時間

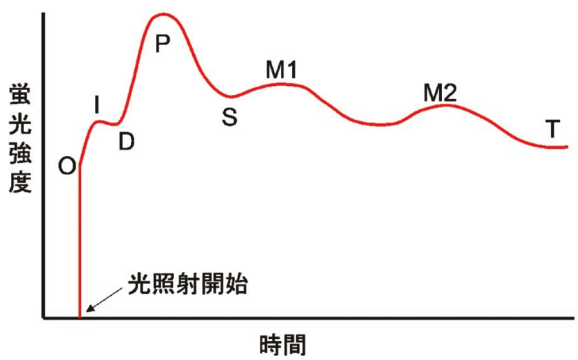



図 1：暗所に順応させた葉に連続光を照射した時の蛍光強度変化の例

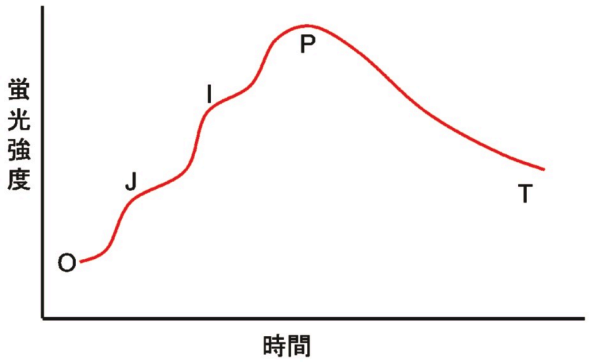



**図 2**：暗所に順応させた葉に飽和光を照射した時のサブミリ秒からの蛍光強度変化を対数目盛で示した例

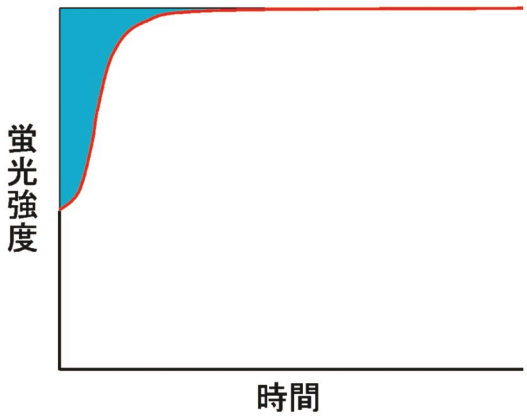



**図 3**：DCMU で処理したチラコイド膜に連続光を照射した時の蛍光強度変化の例

スケールにおいて測定したクロロフィル蛍光を時間を対数にプロットした場合，$F_O$ から $F_P$ への変化は $Q_A$ への電子伝達速度と $Q_A$ から $Q_B$ 以降への電子伝達速度の釣り合いを反映するため，複数の変曲点を持つ複雑な挙動を示す（図 2）．2 つの変曲点（J と I，場合によって $I_1$ と $I_2$ と記述する）を含めた誘導期現象（O-J-I-P）による光合成状態の解析は，Hansatech Instrument 社の Plant Efficiency Analyzer によって簡便に行なうことができ，その方法論は JIP テストとして Strasser らによって定式化されている[3]．Strasser らによって考案されたさまざまなパラメーターは，植物の光合成状態の変化を簡便にスクリーニングする方法として有用であるが，その変化の原因を特定することは通常難しい．

$Q_A$ から $Q_B$ への電子伝達を DCMU の添加により阻害した場合には，$Q_A$ の還元速度だけによって蛍光挙動が決まるため，誘導期現象の立ち上がりは極めて速くなり，またより単純になる（図 3，赤の線で示した変化）．実際には，単一の反応速度でこの蛍光の立ち上がりを記述することはできないが，それは，アンテナサイズの異なる 2 種類の光化学系（$\alpha$ センター，$\beta$ センター）が存在することにより，$Q_A$ の還元速度が均一ではないことによる．$Q_A$ が時間と共に還元される量は図 3 の光照射開始からある時間までの水色の部分の面積として計算しうるため，この面積の時間変化を解析することにより，アンテナサイズの解析などを行なうことができる．

このように，$Q_A$ の酸化還元を反映する光化学消光だけでもさまざまな因子の影響を受けるのに加え，キサントフィルサイクルなどのエネルギーを熱として放散する反応を反映する非光化学消光もクロロフィル蛍光に影響を与えるため，クロロフィル蛍光挙動の解釈には常に困難がつきまとう．これを解決するためには，3.a.2.2 節で述べるように飽和パルス光の導入などにより，要因の切り分けを行なう必要がある．

### 3.a.1.6　ポンプ&プローブ法

蛍光の測定においては，色素を励起するための測定光を試料に当てる必要があるが，従来の方法では，測定光に弱い連続光を使用し，この連続光が光合成を駆動する励起光の役割も果たす．これに対してポンプ&プローブ法では，この測定光に短く強いパルス光を用い，光合成の励起には別の光源（閃光またはパルス光のことが多い）を用いる．ポンプ&プローブの「ポンプ」とは，光合成の励起に用いる最初の閃光照射のことで，「プローブ」はその後のパルス光による測定のことを指す．通常の連続光による蛍光測定の場合は，測定光による励起効果が無視できないが，このようなパルス光を用いた場合は，パルスの持続時間を短くすれば，パルス強度を強くしても，時間平均したときの光の強さは連続光に比べてきわめて小さくなる．従って，ポンプ&プローブ法では，(1) 事実上励起効果を持たない（見かけ上暗所での）蛍光測定が可能になる，(2) 測定パルス光の強度を上げることができるため感度のよい蛍光測定が可能になる，という 2 つの利点がある．このような利点を持つポンプ&プローブ法は，(1) 測定光が励起作用を持つと測定が困難となる，閃光照射後の蛍光時間変化の追跡，(2) きわめて希薄な溶液（例えば海水そのもの）の蛍光測定などの感度を要求される測定，といった場合に用いられる．

通常，ポンプ&プローブ法では，まず，光化学系 II を還元する閃光を照射する（図 4）．この閃光により $Q_A$ はまず還元され，次いで再酸化されるという時間変化を示し，それによって蛍光の収率変化が引き起こされる．この際，最初の閃光照射（t0）からある一定時間後（t0＋Δt）に測定パルス光を照射して蛍光を測定する．この Δt を変化させて繰り返し測定を行うことにより，蛍光の時間変化，つまり $Q_A$ の酸化還元状態の時間変化を知ることができ

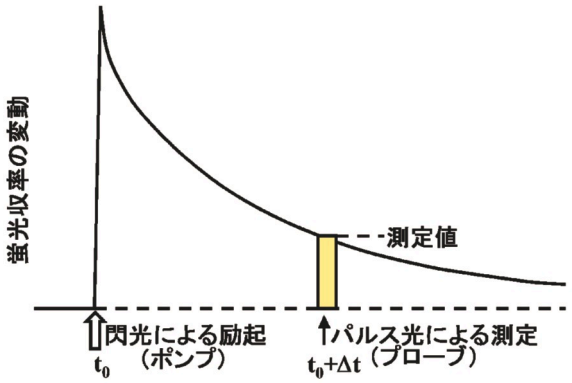



図4：ポンプ&プローブ法による蛍光収率の測定

る．閃光照射後の蛍光の立ち上がり（$Q_A$ の還元）速度は，光化学系IIのアンテナサイズに依存するので，この立ち上がり速度からアンテナサイズに関する情報を得ることができる．また，$Q_A$ の再酸化は，$Q_B$ への電子伝達によって起こるので，図5のように光化学系を1回だけ励起するシングルターンオーバーフラッシュ後の蛍光の減衰の初期速度を見ることによって $Q_A$ から $Q_B$ への電子伝達速度を見積もることができる．特に後者のような情報は，原理的に定常光による蛍光測定では難しく，ポンプ&プローブ法の利点がもっとも良く生かされる測定例である．Waltz 社のキセノン PAM 蛍光測定装置においては，このような測定原理により高感度の測定が可能となっている．測定パルスの励起効果を最低限に抑えるために，通常は1回の励起閃光後の測定で測定パルスは1回しか用いないが，測定パルスの励起効果が無視できるときは，閃光照射後に測定パルスを複数回当てることにより，1回の測定のみで時間変化を求めることもできる．Photon System Instruments 社の二重変調蛍光測定装置においては，この方法がとられている．

特殊な応用例として，蛍光カメラによる2次元蛍光画像時間分解解析が上げられる．蛍光を CCD カメラによって捉えて画像として解析する際に，測定パルスと同期させてシャッターを切ることにより，上記のパルス&プローブ的な効果を得ることができる．この場合，測定パルスとは別に，光合成を励起させるための定常光を当てることにより，蛍光の誘導期現象を2次元画像で捉えることが可能となる（蛍光イメージングの節3.dを参照）．

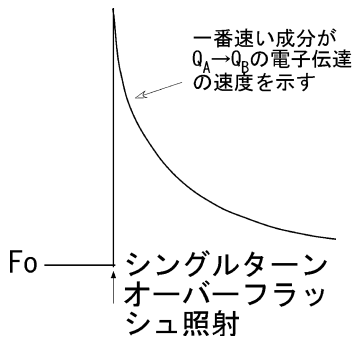



図5：蛍光による $Q_A$ から $Q_B$ への電子伝達速度の測定例

## 3.a.2　パルス変調蛍光測定

### 3.a.2.1　パルス変調蛍光測定

PAM という言葉は Pulse Amplitude Modulation（パルス変調）に由来し，この後半の Amplitude Modulation はラジオで使う AM と同じである．AM ラジオでは，放送局によって決まった周波数のラジオ波を信号に用い，音の強弱を波の振幅の大小に変換して送る．ラジオを聞く人が自分の聞きたい放送局の放送だけを聞くことができるのは，さまざまな周波数のラジオ波のうち特定の（自分の聞きたい放送局の）周波数の信号だけを増幅しているためである．ある周波数成分に信号を載せて送れば，それ以外に他の信号が飛び交っていても，それらの信号が別の周波数成分である限り無視することができる．パルス変調蛍光測定（PAM）においては，この変調の技術を利用してノイズを減らすと共に，以下に述べるようなさまざまな光源を用いた測定が可能となっている．

従来の弱い連続光を使う蛍光測定では，測定光が励起光の役割も兼ねていた．この場合，連続光の強さが弱いと（図6，赤の線で示した変化）蛍光の最大値 Fm を求めることができない一方，光が強くなると（図6，青い線で示した変化）蛍光の立ち上がりが速くなり，$F_o$ を正確に求めることが困難となる．蛍光測定におけるパルス変調とは，この測定光を，短い繰り返しパルス光で行い（図7A），試料からの発光のうち，測定パルス光の繰り返し周期と同じ蛍光成分だけを増幅して測定値とする（図7B）．この方法は，測定にパルス光を用いる点では上述

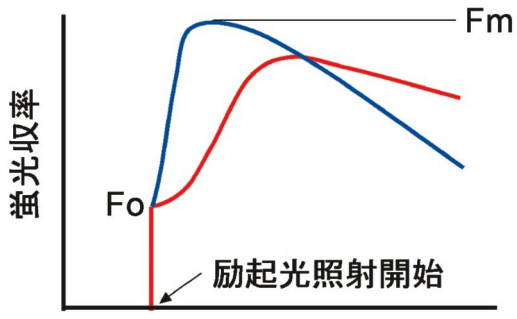



図6：連続光照射によるクロロフィル蛍光測定の問題点（赤：励起光が弱い場合，青：励起光が強い場合）

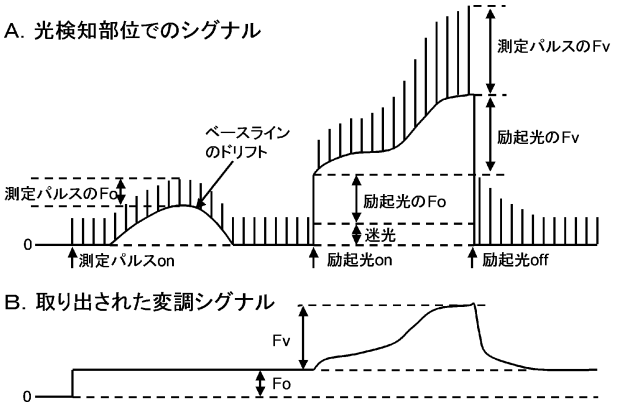



**図7**：パルス変調法による蛍光測定の原理（A：光検知部位での蛍光強度，B：取り出された変調シグナルの大きさ）

のポンプ&プローブ測定と似ているが，一定の周波数（実際には1 kHz～100 kHz）の信号だけを増幅する点が大きく異なる．このような測定方法は，2つの大きな利点をもたらす．1つ目は，ポンプ&プローブ法と同様，測定パルス光の強度をある程度強くしても，パルスの幅を非常に短くすれば，時間平均したときの光の強さを連続光を使用したときに比べて，非常に小さく抑えることができる点である．つまり，適切なパルス強度と周波数を選べば，測定光による光合成系の励起は無視できるくらいに小さくなり，暗所での蛍光 $F_O$ を正確に測ることができる（図8）．さらに，変調という方法の特性上，繰り返し周期を持たない光による蛍光は増幅されないので，他の光が当たっている状態でも測定が可能になる．図7に示すように，ベースラインのドリフトや迷光があっても，それらは繰り返し周期を持たないので，（測定光の周波数と同じ周波数を持つノイズでない限り）信号としては現れないので，非常に安定した感度での測定が可能であり，生葉などでも充分な測定結果を得ることが可能である．同様に外部から連続的な励起光や単発のパルス光を与えた場合も，励起光自体による蛍光は増幅されない（図7 B）．検出されるのは，励起光による蛍光収率の変化のみとなる．つまり，必要であれば，野外で自然光が当たっている条件での蛍光の収率をも測定することができる．ただし，ポンプ&プローブ法に比べると測定パルスの照射回数が非常に多くなるため，励起効果を避けるためには1回のパルス強度は小さくせざるを得ず，一般的に，絶対的な感度はポンプ&プローブ法よりも低くなる．

### 3.a.2.2　飽和パルス光の導入

前節で述べた測定パルス光に加えて，パルス変調蛍光測定においては，もう一種類，飽和パルス光と呼ばれる光源が測定に用いられる．クロロフィル蛍光挙動の解釈を困難にしている1つの原因は，$Q_A$ の酸化還元（光化学

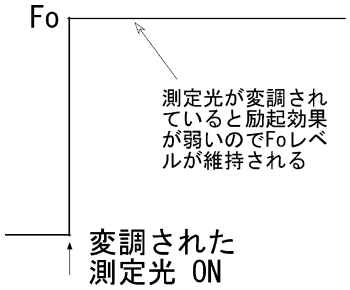



**図8**：パルス変調による $F_O$ の測定

消光）と熱放散系の変化（非光化学消光）という2つの要因が共に蛍光を変化させる点にある．しかし，20 ns程度で起こる $Q_A$ の還元に対して，熱放散系の変化はずっと遅い．従って，光合成を飽和させるような短いパルス光を与えることにより，熱放散の状態は変化させずに $Q_A$ だけを還元することができる．飽和パルス光照射前の蛍光収率と照射中の蛍光収率の差は，$Q_A$ の還元を反映するはずである．一方，この飽和パルス光照射中の蛍光収率は熱放散による影響を主に反映する．このようにして，飽和光を導入することにより，蛍光挙動に影響を与える2つの要因を分離することができる．このようにパルス変調に飽和パルス光を組み合わせることにより光化学消光と非光化学消光を区別して見積もる測定方法をクエンチング測定という．前項で説明したように，パルス変調法によって始めて，飽和パルス光によって引き起こされる蛍光収率の変化を飽和パルス光が励起光となって生じる蛍光の変化から分離できる．飽和パルス光を導入したクエンチング解析はパルス変調法の利点を最大限生かした手法であると言える．

### 3.a.2.3　一般的なクエンチング測定

暗順応させた植物の葉をパルス変調蛍光測定装置による測定する例を以下に紹介する（図9）．測定パルスの照射を開始すると蛍光は $F_O$ レベルまで上がる．前述した

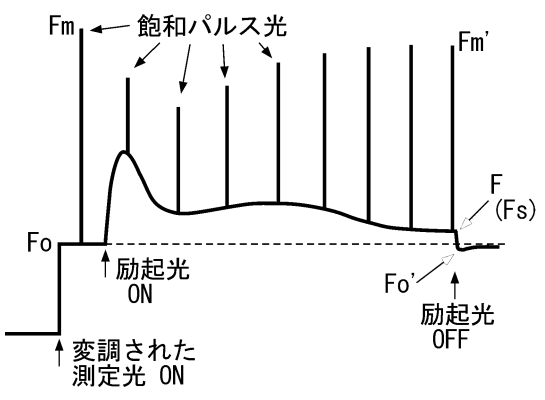



**図9**：パルス変調法への飽和パルスの導入

ように，測定パルス光の時間平均した強さは非常に弱いので，そのままでは蛍光は $F_O$ レベルのまま変化しない．そこへ，飽和パルス光をあてると $Q_A$ が一時的に還元されて蛍光は最大レベルの Fm にまで上昇する．パルス変調の場合，この蛍光レベルの上昇は，飽和パルスが励起した色素からの蛍光が加わるためではなく，飽和パルスによって $Q_A$ が還元されて蛍光の収率が上がったことによる間接的な影響が現れるためである．一般的にパルス変調測定方法においては，蛍光の収率の変化を測定していると考えてよい．飽和パルス光は通常 10－20 秒間隔であて続けることが多い．次に光合成を駆動する励起光の照射を開始する．これは連続光なので，やはり励起光による直接の蛍光は観察されず，励起光により蛍光の収率が変化した間接的な結果として蛍光収率の変化が見られる．蛍光レベルは光化学消光と非光化学消光の 2 つの要因により変化しながら最終的に一定の値 Fs（F という場合もある）に落ち着く．一方，この間，飽和パルス光があたっている時には $Q_A$ は完全に還元されるので，その時の蛍光強度 Fm'は非光化学消光の影響だけを受けることになる．つまり，Fm' の値をつないだ線の変化は，非光化学消光の変化を示すことになる．励起光を停止すると，$Q_A$ の酸化により蛍光は減少するが，その時の蛍光の最小レベル $F_O$' は最初の $F_O$ レベルより小さくなる場合がある．これは，励起光停止後，$Q_A$ の再酸化は速やかに起こるのに対し，非光化学消光の解消は遅いため，非光化学消光により蛍光強度が $F_O$ レベルよりもさらに減少することによる．

この測定によって得られるそれぞれの時点における蛍光の強度（$F_O$，Fm，Fm'，Fs，$F_O$'）から蛍光パラメーターを計算することにより光合成の状態を知ることができる．パラメーターの意味及び計算方法は次節に譲り，ここでは，実際の測定にあたっての注意点について述べる．

### a）暗順応の時間

測定前の暗順応の時間は，測定が何を目的としているかによって異なる．もし，電子伝達の量子収率 $\Phi_{II}$ のみを知りたいのなら，パラメーターの算出には Fm や $F_O$ は必要ないので，そもそも暗順応をする必要はない．場合によっては，励起光すら必要でなく，栽培・培養している所へ，単にパルス変調測定装置のグラスファイバーを近づけて測定すれば生育光強度での $\Phi_{II}$ は求まる．次に，短時間のストレス処理などをした後の光合成効率の変化などを知りたいときには，暗順応は 5 分程度で測定することになる．当然ながらストレスの影響は処理終了後，徐々に小さくなるので，あまり長く暗順応を行なうと，結局処理の効果を見ることができない．逆にその植物の葉の最大の能力を知りたいときには，非光化学消光などがほぼ解消すると思われる 30 分以上の暗順応をすることが望ましい．ただ，冬季の樹木の葉などでは，日中の低温光ストレスによる光合成効率の低下が，夜の間に完全には回復せず朝まで残る例なども報告されており，30 分おけば最大能力が求まるとは断言できない．

### b）励起光照射の時間

励起光の照射を開始したあとには，一時的な蛍光収率の変動があり，通常は数分でその変動が Fs に落ち着く（定常状態になる）ので，そこで励起光を停止して $F_O$' を測定する．しかし，場合によっては，だらだらと蛍光収率が（たいていは低い方へ）変化し続けるような場合もある．特に，光阻害に弱い変異体を生育光と異なる光環境においた場合など，なかなか定常状態にならない場合がある．光阻害が時間によって進行するような場合は数時間蛍光強度が変化し続ける場合もあるので，基本的には大きな変動が落ち着いた状態を準定常状態と考えて励起光を打ち切ることになる．また，一定値になるのを待っていると $F_O$ より蛍光が小さくなってしまう場合もある．これは，シロイヌナズナの変異体などにおいてはしばしば見られ，非光化学消光が非常に強く誘導されることが原因であると考えられる．この場合には，Fs が一定の値に落ち着くのであれば，$F_O$ よりも値が小さくなること自体は問題ない．いずれの場合においても，励起光を止めた後に，再び元の $F_O$ のレベルに戻るかどうかが一つの判断の目安となる．$F_O$ レベルに戻らない場合は，不可逆的な阻害が進行していると考えられ，より励起光を弱くするなどの対策が必要となる．

### c）$F_O$'の測定

上述のように，強い励起光照射下では $F_O$ 自体も非光化学消光にによって $F_O$' まで低下する．この $F_O$' のレベルを求めるためには，非光化学消光が減衰しないうちに $Q_A$ の再酸化が完了する（光化学消光が 0 になる）必要がある．光化学系 II の下流に何らかの阻害が見られる場合などは，励起光を消すと同時に光化学系 I に選択的に吸収される 700 nm 以上の光を照射して $Q_A$ の速い再酸化を保証する必要がある．ただし，藻類やシアノバクテリアにおいては，第 5 章で述べるように暗順応した状態で，既に蛍光の消光が見られるため，$F_O$' のレベルが $F_O$ レベルよりも高くなる場合が多い．陸上植物においても，$F_O$' レベルの測定をきちんと行なうことはそれほど容易ではなく，励起光が弱い場合などにおいては $F_O$' レベルが $F_O$ レベルより大きくなる場合もあり，パラメーターの計算において，$F_O$ で代用する場合もある．また，$F_O$' を実測

せず，

$$F_o' = F_o/\{(Fv/Fm)+(F_o/Fm')\} \quad (1)$$

という式を用いて，計算で求める方法も提案されている[4]．

この他の測定機器の設定項目の調整については 3.a.4 で述べる．

## 3.a.3　クエンチング測定結果の定量化と解釈

### 3.a.3.1　qN と NPQ

上述のように，蛍光の誘導期現象を引き起こす原因は，光化学消光と非光化学消光にわけて考えることができるので，それぞれを分離して定量化することが必要となる．蛍光の強度自体は励起光の強さ，試料中のクロロフィル濃度などによって変化してしまうので，他の試料・条件と比較することはできない．そこで，相対値の形をとることになる．

暗順応した葉の蛍光の収率は，$Q_A$ の酸化還元に依存して，値が $F_o$ から Fm まで変化する．ここにある一定の励起光があたると，非光化学消光が増大することにより，蛍光の値は，$Q_A$ が完全に還元しているときは Fm から Fm' へ，完全に酸化しているときは，$F_o$ から $F_o'$ へ低下する．また，Fm と $F_o$ の差である Fv は Fv' へと低下する．そこで，ある励起光照射によって，どれだけ蛍光収率が低下するかを qN という以下のようなパラメーターを使って表す．

$$qN = 1-(Fm'-F_o')/(Fm-F_o) = 1-Fv'/Fv \quad (2)$$

この qN は非光化学消光の指標となる．消光（quenching）とは蛍光収率が減少することで，この計算式では，熱になる反応が大きいときに消光のパラメーターが大きくなるように，1 から引き算をしている．暗所では，Fv'＝Fv なので qN は 0 になる（高等植物の場合，シアノバクテリアの場合は 3.a.5 を参照）．一方，消光が最大限になって $Fm' = F_o'$（Fv'＝0）となる時，qN は 1 になる．つまり，qN は非光化学消光の大きさに依存して，0 から 1 の値を取る．単に消光を定量化するだけなら 1−Fm'/Fm でも 1−$F_o'/F_o$ でもよいが，その場合，Fm' や $F_o'$ は 0 にはならないので，定量化した値は 1 までは大きくならない．Fv を使うと（実際に実現するかどうかは別として）理論的には qN＝1−Fv'/Fv は 1 になりうる．

非光化学消光の主な原因は，1）チラコイド膜のプロトン濃度勾配ができたときのキサントフィルサイクルなどによる過剰エネルギー消去，2）アンテナ複合体の反応中心間の移動（ステート遷移）による蛍光収率の減少，3）光化学系 II の光阻害による蛍光収率の減少が主なもので，高等植物においては，プロトン濃度勾配によって誘導されるキサントフィルサイクルの寄与が大きい（図 10）．この 3 つの成分を区別して測定する方法が，Quick and Stitt によって提案されている[5]．励起光を切ったあとの非光化学消光の解消を考えた場合，プロトンの濃度勾配は，ATPase を通したプロトンの流出により数十秒の時間スケールで解消する一方，ステート遷移は 10 分程度で起こり，光阻害の修復には通常数十分の時間を必要とする．従って，これらの 3 つの要因は，励起光を消した後の qN の低下（Fm' の上昇）の時間経過を観察すれば区別することができることになる．励起光を消したあとも飽和パルス光を当て続け，その飽和パルス光による蛍光の変化を観察していき，それぞれの時点の Fm'の大きさから図 11 のように a，b，c などを求めると，Quick and Stitt の計算式では，

$$q_f = 1-a/c \quad (3)$$
$$q_m = 1-c/d \quad (4)$$
$$q_s = 1-d/e \quad (5)$$

として，蛍光消光のうち早く減衰する成分 f，中間の成分 m，遅い成分 s を分けることができる．これらの数値は，

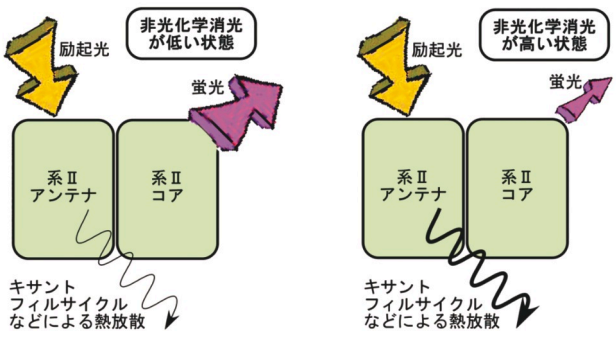



図 10：非光化学消光の概念図

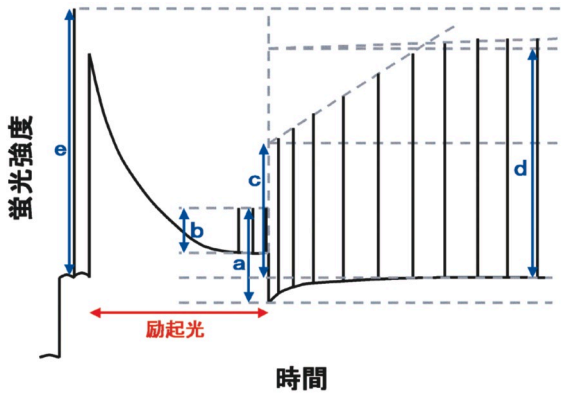



図 11：非光化学消光の解析例

$$qN = 1 - a/e \quad (6)$$

であることを考えると，全体の非光化学消光 qN と

$$1 - qN = (1 - q_f)(1 - q_m)(1 - q_s) \quad (7)$$

という関係で結びつけられる．つまり各成分の積で全体が表されることになる．そしてこれらの成分は，阻害剤を使った実験などに基づき，それぞれプロトン濃度勾配による項 qE，ステート遷移による項 qT，光阻害による項 qI に相当すると解釈される．

さて，これだけだと簡単そうで，実際にあまり考慮を払うことなくこの方法を適用している論文も見られるが，実際には，3 つの成分がきちんと分かれる条件は，植物によっても異なることが報告されている．考えるべき条件としては，飽和パルス光の間隔と強さがある．飽和パルス光の間隔については，オオムギの葉では 100 秒以上の間隔をあければ，非光化学消光の緩和が妨害されないと報告されている．飽和パルス光の強さについては，非光化学消光が強く誘導されている条件では，光捕集効率が当然低下しているので，より強い光が飽和に必要となる．オオムギの葉の場合は，励起光を切って 5 秒後の時点では，3,400 $\mu$mol/m²/s の光でもまだ飽和しないという報告がある．励起光を切って 30 秒以上すれば 2,100 $\mu$mol/m²/s の光で飽和するとのことなので，30 秒以後のデータだけを用いれば問題ないと思われる．

qN のかわりに NPQ というパラメーターを非光化学消光の指標として用いる場合もある．qN は，その計算式の中に，$F_o$' を含むために，きちんと計算しようとすると励起光を一旦消して測定を行なう必要があり，連続的な測定ができない．そこで，

$$NPQ = (Fm - Fm')/Fm' \quad (8)$$

というパラメーターが考案された．これならば，最初に暗所で Fm を測っておけば，あとは，連続的に Fm' を測定していくだけで，パラメーターを計算できる．また，このパラメーターは，どれだけ Fm が励起光によって消光されて Fm' になったかを，相対的に示すものなので，直感的にも理解しやすい．このパラメーターは，分母が Fm ではなく Fm' になっているので，1 以上の値を取ることもある．qN も NPQ も厳密な理論的バックグラウンドがあるものではなく，経験的なものである．従って，実用的に使いやすい方を使えばよいと考えて構わない．一般に，弱光領域では qN の方が大きく変化するので，弱光領域での非光化学消光の変化を敏感に捉えたいときは qN がよい．一方，qN は強光領域では飽和するので，強光領域も含めた広い領域の変化を捉えたいときは NPQ の方がよいだろう．また，NPQ は，F から F' への蛍光の消光に関する Stern-Volmer の関係

$$F/F' = 1 + k\tau\,[Q] \quad (9)$$

が Fm において成り立つとした時の $k\tau$[Q] に相当するので，消光物質の濃度 [Q] と比例関係にあると考えられる（k は消光の速度定数，$\tau$ は蛍光寿命）．そのため，非光化学消光の原因となるキサントフィルの脱エポキシ化の程度や，非光化学消光を起こす物質の濃度，非光化学消光の反応速度などとの相関は NPQ の方が高いとされる．キサントフィルサイクルや非光化学消光との定量的な関連づけを行いたいときは NPQ の方が適切である．

### 3.a.3.2 qP と qL，$q_{CU}$

次に，光化学消光の定量化を考える．光化学消光においては，$Q_A$ の還元に伴って蛍光収率が増大すると考える（図 12）．ある一定の励起光があたっているときは，非光化学消光によって蛍光の収率は変化し，$Q_A$ が完全に酸化もしくは完全に還元されている時の蛍光強度は，それぞれ $F_o$' および Fm' になる．励起光のもとでの定常状態になったときの蛍光 Fs を考えた場合，その時の $Q_A$ の酸化還元状態に応じて Fs は $F_o$' と Fm' の間の値を取るはずである．そこで，$F_o$' と Fm' の差を 1 として Fs を標準化した値を qP とすると

$$qP = (Fm' - Fs)/(Fm' - F_o') \quad (10)$$

となる．$Q_A$ が完全に還元されたときは Fs＝Fm' となるので qP は 0 に，完全に酸化されたときは Fs＝$F_o$' となるので qP は 1 となる．つまり，qP は，$Q_A$ の酸化還元状態に応じて 0 から 1 の値を取ることになる．

このパラメータは，当初，蛍光強度が $Q_A$ の酸化還元状態を反映するという経験的な事実に基づいて考案されたが，光化学系 II が複合体間でエネルギー移動を行なわないというモデル（puddle model）を前提にした場合には，

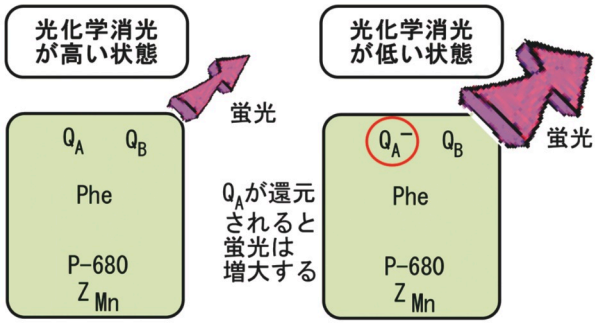



図 12：光化学消光の概念図

理論的に上式を導き出せることが示されている．しかしながら，実際の光化学系IIにおいては，複合体間のエネルギー移動が認められる．光化学系IIがアンテナを全て共有しているとするモデル（lake model）をもとに考案されたパラメーターqL は

$$qL=(F_o'/Fs)\cdot(Fm'-Fs)/(Fm'-F_o')=(F_o'/Fs)\cdot qP \quad (11)$$

となり[6]，qP と qL の間には直線関係はない．lake モデルと puddle モデルの中間の状態をモデル化した connected unit モデルでは，光化学系IIの複合体間にある一定の確率でエネルギー移動が起こると仮定する．そこから導き出されるパラメーター$q_{CU}$ は，エネルギー移動の確率を p とした時に

$$q_{CU}=(Fm'-Fs)/((Fs-F_o')\cdot p/(1-p)+Fm'-F_o') \quad (12)$$

として表すことができる[6,7]．当然のことながら，p＝0 では $q_{CU}$ は qP に一致する．陸上植物では p＝0.6 程度であるとの報告があり，その場合，$q_{CU}$ は qP よりは qL に近い値を示す．

従って，一般的にもっともよく使用される光化学消光のパラメーターである qP は，$Q_A$ の酸化還元状態との直線性という観点からすると，必ずしも適切ではないと考えることができる．ただし，多くのクロロフィル蛍光測定においては，$Q_A$ の酸化還元状態との直線性よりも過去の文献の値との比較の方が重要である場合が多く，その意味では過去の蓄積の多い qP の有用性は高い．

### 3.a.3.3 Fv/Fm と Fv'/Fm'

次にもっとも有名なパラメータといってもよい Fv/Fm を考える．このパラメーターは，Kitajima and Butler によって最初に提出されたもので[8]，極めて簡単な前提から導出することができる．吸収した光エネルギーが，1）蛍光になる，2）光合成に使われる，3）熱になる，4）それ以外の方法で消光される，という 4 つの運命のどれかをたどると考え，それらの反応が $k_F$，$k_P$，$k_D$，$k_Q$ という反応速度定数を持って競争しているとする．その場合，蛍光の収率は

$$\Phi_F=k_F/(k_F+k_P+k_D+k_Q) \quad (13)$$

となる．つまり，どれだけが蛍光になるかは全体の反応速度の中で，蛍光の反応速度がどれだけ速いかによって決まると考える．ここで，蛍光の収率と光合成の収率の関係を他の条件（$k_D$，$k_Q$）が変化しないとして考えた場合，光合成が働かない時（$k_P=0$）に蛍光の収率 $\Phi_F$ は最大値 $\Phi_{FM}$ を取るはずである．一方，光合成速度が最大の時（$k_P=k_{PM}$），蛍光の収率は最小値 $\Phi_{FO}$ を取る．ここで，今度は光合成の収率 $\Phi_P$ の最大値 $\Phi_{PM}$ を考えると

$$\Phi_{PM}=k_{PM}/(k_F+k_{PM}+k_D+k_Q) \quad (14)$$

となる．さて，Fm，$F_o$ あるいは Fv はある時点での蛍光の強さを示すが，比のかたちであれば蛍光の収率に置き換えることもできるので，

$$Fv/Fm=(Fm-F_o)/Fm=(\Phi_{FM}-\Phi_{FO})/\Phi_{FM} \quad (15)$$

ここに，先ほどの式を $k_P$ の値（0 または $k_{PM}$）を考えながら代入すると

$$Fv/Fm=\{k_F/(k_F+k_D+k_Q)-k_F/(k_F+k_{PM}+k_D+k_Q)\}/\{k_F/(k_F+k_D+k_Q)\} \quad (16)$$

分子と分母に$(k_F+k_D+k_Q)/k_F$ をかけ算すると

$$Fv/Fm=1-(k_F+k_D+k_Q)/(k_F+k_{PM}+k_D+k_Q) \quad (17)$$

これを変形すると

$$Fv/Fm=k_{PM}/(k_F+k_{PM}+k_D+k_Q) \quad (18)$$

となるが，これは結局先ほどの式の右辺が同じなので

$$Fv/Fm=\Phi_{PM} \quad (19)$$

が導け，Fv/Fm が光合成の最大収率を示すことになる．この式の前提では 2.2 で説明した lake モデルが使われているが，この場合は puddle モデルを用いても全く同じ結果になる．

この Fv/Fm は暗順応した葉に飽和パルス光をあてるだけで求まる（図 13）ので測定が極めて簡便であり，広く使われている．高等植物では，最適条件で 0.8-0.83 の値が得られ，測定の再現性も高い．酸素発生の量子収率（1 光子あたり何分子の酸素が発生するか）は最適条件で，0.106 という報告がある．8 光子で 1 分子の酸素が発生し得ることを考えると理論上の収率は 0.125 になるはずであり，ここから予想される光合成の量子収率は

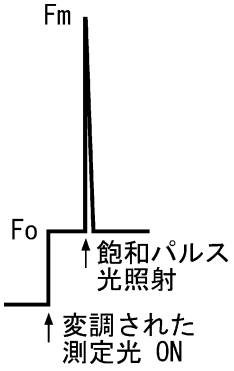



図 13：Fv/Fm の測定例

0.106/0.125＝0.85 となって Fv/Fm の実測値とほぼ一致する．

3.a.1.5 で述べたように，クロロフィル蛍光の収率変化は光化学系Ⅱにおいて起こり，$F_O$ から Fm への変化が $Q_A$ の還元に伴って誘導されることを考えると，この Fv/Fm というパラメータは光化学系Ⅱにおける P 680 と $Q_A$ の間の電荷分離の量子収率を反映する．従って，$Q_A$ から $Q_B$ への電子伝達が何らかの要因（例えば DCMU の添加など）で阻害された場合でも，理想的な条件下では Fv/Fm は変化しないはずである．しかし，実際には，$Q_A$ から $Q_B$ への電子伝達が阻害された条件では，微弱な光によっても $Q_A$ の還元型の蓄積が起こるため，測定光パルスによる $F_O$ の上昇が見られ，結果的に見かけ上の Fv/Fm の低下が見られる．同様に，マンガンクラスターから Z までの酸素発生系が阻害された場合にも，飽和パルス光をあてている間の電子伝達が不十分になることから $Q_A$ の還元が不十分になって Fm が低下し，結果として見かけ上 Fv/Fm が低下する．従って，Fv/Fm は光化学系Ⅱのさまざまな収率低下を反映することになり，ストレス応答研究などにおいて光化学系Ⅱの機能低下の指標として広く使われている．

Fv/Fm は暗所において $Q_A$ が完全に酸化している条件での量子収率であるが，光が当たっている状態では，$Q_A$ が部分的に還元され，同時に非光化学消光も誘導される．そのような条件での $Q_A$ が酸化されている（open な）光化学系Ⅱの量子収率を Fv'/Fm' として考えることができる．Fv/Fm が理論的に導出しうるものであるのに対して，Fv'/Fm' は半ば経験的なパラメーターであると考えた方がよい．それでも，Fv'/Fm' の振る舞いは qP と組み合わせることにより，次に述べるように極めて効果的に光合成の電子伝達の量子収率を記述することができる．

### 3.a.3.4 $\Phi_{II}$ と ETR

前述のように，ある一定の光が当たっている状態での，$Q_A$ が酸化された状態の（open な）系Ⅱの量子収率が Fv'/Fm' であるが，同じ条件で，$Q_A$ が還元された（close な）系Ⅱにおいては光化学反応は進行しないので，その量子収率は 0 として考えることができる．この場合，$Q_A$ が酸化された光化学系Ⅱの割合を qP とすれば，系Ⅱを通る電子伝達の実効量子収率は，qP と Fv'/Fm' の積となるはずである．このパラメーターを $\Phi_{II}$（$\Phi_{PSII}$ もしくは Yield と表記されている場合もある）と呼ぶ．この $\Phi_{II}$ は，

$$\begin{aligned}\Phi_{II} &= qP\cdot(Fv'/Fm') \\ &= (Fm'-Fs)/(Fm'-Fo')\cdot(Fv'/Fm') \\ &= (Fm'-Fs)/Fm'\end{aligned} \quad (20)$$

と変形できるので，ある時点における蛍光 Fs とその時点で飽和パルス光をあてた時の蛍光 Fm' の 2 つの値があれば求まる．このように，極めて簡便に測定できるパラメーターでありながら，この値は実際に別の方法で求めた電子伝達の量子収率と非常によい相関があることが確かめられている[9]．

ここで，1 つ注意しなくてはならないのは，この $\Phi_{II}$ は光化学系Ⅱを通る電子伝達の量子収率ではあるとはいえ，その値が光化学系Ⅱ以外の要因によっても左右されることである．$\Phi_{II}$ のうち Fv'/Fm' の部分は光化学系Ⅱの状態によって決定するが，qP は，シトクロム $b_6/f$ 複合体であれ，光化学系Ⅰであれ，炭酸固定系であれ，光化学系Ⅱの下流に存在するコンポーネントが機能を失った場合は小さくなり，結果として $\Phi_{II}$ も小さくなる．従って，何らかの条件または処理で，電子伝達の量子収率 $\Phi_{II}$ が減少していた場合，その原因が qP にあるのか，Fv'/Fm' にあるのかを分けて考えてみれば，原因が光化学系Ⅱの下流にあるのか，光化学系Ⅱ自体にあるのかを見極めることができる．Fv'/Fm' が低下していた場合に Fv/Fm が低下していれば，光化学系Ⅱの最大量子収率自体が低下していることになり，そうでなければ，励起光をつけたときに光化学系Ⅱの量子収率を低下させる何らかのメカニズムが働いていることになる．後者であれば，熱になる反応の量子収率が高くなる場合が多いので，通常，qN（NPQ）の上昇が観察される．このようにして，光合成の低下の原因を切り分けることが可能である．

なお，この $\Phi_{II}$ に関しては，光化学系Ⅱのエネルギー移動モデルから導出可能であり，しかも，lake モデルでも puddle モデルでも同じ結果を与える．このことは，qP が puddle モデルからのみ示されることを考えると，Fv'/Fm' が qP と同様モデル依存的であることを示す．従って，$Q_A$ の酸化還元状態（光化学消光）の指標として qL を用いる場合は，Fv'/Fm' の代わりに $(Fs/F_O')\cdot Fv'/Fm'$ を考える必要がある．

さて，$\Phi_{II}$ は電子伝達の量子収率なので，これに吸収された光量子数をかければ，電子伝達の速度（ETR と略称）が求まるはずである．あたっている光量子数はすぐに測定でるが，吸収された光量子数の実測は簡単でないため，蛍光測定機器についているプログラムでは，照射光量子数に葉の吸収係数として 0.84 をかけて吸収された光量子数としている場合が多い．実際の葉の吸収係数は植物種によっても葉によっても異なるので，このようにして求められる ETR は便宜的なものであることに注意しなければならない．さらに，光化学系は光化学系Ⅰと光化学系Ⅱが直列に電子伝達を行なうので，吸収された光の

うちどれだけが光化学系IIに分配されるかによって電子伝達速度の見積は異なることになる．一般的に，反応中心あたりのアンテナクロロフィルの数は，高等植物においては光化学系I，系IIともに200程度なので，光化学系Iと光化学系IIはほぼ1：1に光を吸収すると考え，

$$ETR=\Phi_{II}\cdot PAR\cdot 0.84\cdot 0.5 \qquad (21)$$

として計算している例が多い．ここでPARというのは光合成有効放射 Photosynthetically active radiationの略で，クロロフィルが吸収できる範囲の波長の面積時間あたりの光量子数である（単位は mol $m^{-2}s^{-1}$）．

このようにして計算したETRは，必ずしも炭酸固定速度の実測値と一致しない．これは，上記の前提（葉の吸収係数や光化学系間のエネルギー分配比）が正確ではないことにも由来するが，電子伝達によって作られた還元力のうちに炭酸固定に使われない部分があることも大きな要因となる．この点については，本書の光合成とクロロフィル蛍光の同時測定の項で述べられている．

なお，ETRの推定は，照射光量子密度が高い領域では収率 $\Phi_{II}$ が小さくなるため誤差を多く含むようになる．一方で，照射光量子密度の測定自体は比較的小さい値でも誤差が少ないので，一般的にETRの相対的な誤差は照射光量子密度が低い領域でも比較的小さい．これは，ガス交換による光合成速度の見積などの場合と逆であるので注意が必要である．

### 3.a.3.5　その他のパラメーター

上記の一般的なパラメーターの他に，吸収した光エネルギーの行方という観点からいくつかのパラメーターが提案されている．そのうちの一つ，Excessというパラメーターの考え方においては，吸収したエネルギーを，反応中心に伝えられる前にLHCII内でキサントフィルサイクルなどで消去される部分と，反応中心に伝えられる部分に分け，この割合は，反応中心がcloseであるかopenであるかによらないとする．つまり，openな反応中心では反応中心にエネルギーが伝わる収率がFv'/Fm'であるが，これがcloseな反応中心でも成り立つとする．逆に言うと，1−Fv'/Fm'がLHCII内で安全に消去されたエネルギーとなる．残ったFv'/Fm'が反応中心へと伝えられ，このうち反応中心がopenなものでは，電子伝達にエネルギーが使われるので，電子伝達の収率は前項で述べたようにqP･(Fv'/Fm')になる．一方，残りのcloseな反応中心にいったエネルギーを

$$D=(1-qP)\cdot(Fv'/Fm') \qquad (22)$$

と定義し，光化学反応にも使われず，かつキサントフィルサイクルなどによって安全に消去されることもなかった「過剰な」エネルギーとしてExcessと呼ぶ[10]．実際にDの大きさは光阻害の速度とよい相関を持つことがKatoらによって報告されている[11]．

一方，光阻害は光化学反応の結果生じるものであり，「過剰な」エネルギーによって説明されるべきではないとする考え方もある．その場合，吸収されたエネルギーは，1）光化学反応に使われる割合 $\Phi_{II}$，2）光によって誘導される熱放散系によって熱になる割合 $\Phi_{NPQ}$，3）熱または蛍光になる定常的な割合 $\Phi_{f,D}$，のどこかへ使われることになる．これをlakeモデルから導くと，

$$\Phi_{NPQ}=Fs/Fm'-Fs/Fm \qquad (23)$$

$$\Phi_{f,D}=Fs/Fm \qquad (24)$$

となり，これらに $\Phi_{II}=1-Fs/Fm'$ を足した合計は1となる[12]．ほぼ同じ意味を持つパラメーター $\Phi_{NPQ}$ と $\Phi_{NO}$ がもう少し複雑な形式で定義されている[6]．

## 3.a.4　パルス変調クロロフィル蛍光の測定条件

### 3.a.4.1　測定光の設定

パルス変調における測定光は，通常1マイクロ秒程度の長さのパルス光である．WaltzのPAMシステムでは，650 nm付近に発光極大があるLEDが測定光に使われ，周波数，強度を最大に設定したときの平均光量子密度は10 $\mu$mol $m^{-2}s^{-1}$ 程度である．パルス変調による蛍光測定の眼目の1つは，測定光による光合成の励起がほとんどなくすことができる点であるが，設定がいい加減な場合，これが実現しない場合がある．光合成系が励起されているかどうかは，測定パルス光をonにしたのちに，蛍光強度が変化していないかどうかでチェックできる．測定パルス光はきわめて短い時間（WalzのPAMシステムの場合100 $\mu$ 秒以下）で安定するので，もし，スイッチを入れたあとに蛍光強度の増加が見られたら，測定パルス光による励起効果と考えられる．測定パルス光の強度を高く設定せざるをない場合は，測定の直前まで測定パルスをoffにしておくとよい．

測定パルス光の強さは，1）パルスの持続時間，2）パルスの強さ，3）パルスの周波数，という3つのパラメーターのかけ算で決まる．このうち，パルスの持続時間は通常変えられない．また，パルスの周波数も，通常固定か，2種類の切り替えであり，連続的には変えられない．従って，実質上は，測定パルスの強さを変化させて，励起効果のない最大限の強さで測定すればよいことにな

る．

測定パルスの周波数が切り替えられる場合は，測定パルスの周波数が高いと励起効果も高くなるので，通常，低い周波数で測定を開始し，連続励起光の照射開始時，もしくは，励起用フラッシュ光の照射の直前に，高い周波数に上げることになる．Waltz の PAM ではこの切り替えを Auto 100 kHz モードという方法で行なう．この場合，トリガーによって飽和パルス光照射の 3 ms 前に周波数を自動的に切り替えることができる．周波数が高ければより大きなシグナルが得られ，従って信号ノイズ比（S/N 比）を減らすことができる．また，1 kHz の周波数で測定すれば，測定間隔は 1 秒に 1000 回なので 1 ms より速い変化は検出できないが，100 kHz の周波数で測定すれば 10 $\mu$s の変化まで捉えることができる．$Q_A$ の酸化還元のような速い時間スケールの測定を行う場合は，高い周波数での測定が必須となる．ただし，$Q_A$ の再酸化速度の測定の時のように単発の飽和パルス光の直前に高い周波数に切り替える場合は，パルスのあと，励起光がない状態で高い周波数での測定を続けると，蛍光強度変化の遅い成分が強調された形になる可能性があることを頭に置いておく必要がある．このような場合は，タイマーを使って 10 ms 程度でもとの周波数に戻すのがよい．

### 3.a.4.2　飽和パルス光の設定

飽和パルス光は $Q_A$ を完全還元するのに充分なだけ強くなくてはならない一方，光合成系への一般的な影響を最小限にするため必要以上に強くてはならない．飽和パルス光の影響の大きさも，パルスの持続時間と強度のかけ算で決まる．一般的に，高等植物の葉では，連続光源からの 800 ms 程度の持続時間に設定したパルスが使われる．Waltz の PAM システムで使われる連続励起光光源 FL103 は Schott の KL1500 という光源を改造したもので，スイッチをオンにした直後の過電流を避けるため，最初の 300 ms は光が照射されず，さらに最大の光強度に達するまでに 200 ms かかる．従って，持続時間を 800 ms に設定した場合，実際に所定の光強度があたっている時間は，800－300－200＝300 で 300 ms ということになる．パルス強度は，実際に何段階か変えてみて，一番高い Fm を与える強度を選ぶのがよい．変調がうまく働いているときは，原理的には飽和パルス光自体は測定装置に影響を与えないが，飽和パルス光があまりにも強いと飽和パルスの反射光などが測定フォトダイオードに入ることによる影響を充分に除けなくなる．その場合は，光源に 700 nm 以下の光だけを通す short-pass フィルターを入れることにより，測定フォトダイオードを保護することができる．ちなみに，Waltz の PAM システムでは，測定光の平均光量子密度の 100 万倍までの非変調光は，変調作用によりシステムに影響を与えないとされている．

連続光源を使う代わりに，閃光を飽和パルス光として使う場合もある．閃光の場合，持続時間は 50 ms 程度必要となる．この場合，持続時間が短いので，充分光が飽和しているかどうかを確認する必要がある．また 50 ms という短い持続時間では，記録計のペンの速度が追いつかない場合がほとんどなので，Waltz のマルチプルターンオーバーフラッシュについているようなデータ保持機能を通して記録計に出力するか，オシロスコープやパソコンへデータを取り込んで処理する必要がある．なお，高等植物とは異なって，シアノバクテリアや藻類では，非光化学消光による蛍光強度の減少が非常に速い時間スケールで起こる（3.a.5 参照）．この場合も，正確な Fm の測定のためには，データ保持機能やオシロスコープ，パソコンの使用が必要となる．また，Waltz のマルチプルターンオーバーフラッシュには初期設定で青色フィルターが入っており，これは陸上植物においては問題ないが，紅藻やシアノバクテリアにおいてはフィコビリンを励起しないために飽和光として十分に働かない場合がある．その場合は，フィルターを取り外す必要があるが，その状態で陸上植物の葉の測定を行なうと強すぎる励起光による副作用が出る場合があるので注意を要する．

### 3.a.4.3　励起光の設定

励起光をどれだけの強さにするのかは，実験の目的によって異なる．一番よいのは，励起光の強さをふって，励起光強度依存性をきちんと測定することである．シアノバクテリアにおける qN の励起光強度依存性のように，それによって新しい情報が得られる場合もある（3.a.5.3 参照）．もし，1 つの励起光強度に決める必要がある場合には，測定する植物または細胞を栽培・培養していた光強度で行うのがもっとも一般的である．いずれにせよ，Fv/Fm 以外の全ての蛍光のパラメーターは励起光の強度に依存して変化するので，実験条件としてきちんと論文に明記することが必要である．

### 3.a.4.4　その他の設定項目　感度，応答速度

感度（ゲイン）は，信号の増幅度であり，これが高ければシグナルは大きくなるが，ノイズも大きくなる．従って，きちんとシグナルが見えている範囲内では低い方がよいと言える．シグナルの大きさは，前述のように測定パルスの強度にも依存するので，もしノイズが非常に大きく，かつ，$F_O$ の正確な決定が目的でない場合（例えば $\Phi_{II}$ の情報だけ必要な場合など）は，感度を上げる代わり

に測定パルスの強度を上げるという方法もある．いずれにせよ，感度と測定パルスの強度の組み合わせで考える必要がある．

応答速度（レスポンス，ダンピング）は，測定回路が，どれだけ速い変動にまで追随するかを決める．応答速度が速ければ(ダンピングが小さければ)，速い変化もきちんと捉えることができるが，信号の平均化効果が期待できないのでノイズは大きくなる．$Q_A$ の酸化還元のような速い反応を測定する場合は，応答速度（レスポンス）を最大にする（ダンピングを最小にする）必要がある．連続励起光による速い蛍光誘導期現象の測定では 1 ms 程度の応答速度，秒単位の変化だけを測るのだったら，0.1 s 程度の応答速度で充分である．ただし，DCMU 添加時の蛍光の立ち上がりの測定などには 10 $\mu$s 程度の応答速度が必要となる．基本的に，測定したい変化のうち，最も速い変化の速度定数より，少し速い応答速度を選ぶことになる．$F_0$ の測定だけであれば，基本的に測定値が変化しないので，一番遅い応答速度にしても構わない．DCMU の存在下で $Q_A$ から $Q_B$ への電子伝達が阻害されている場合や，低温での測定では，$Q_A$ の再酸化速度が遅くなるので，測定光の励起効果を最低限にしないと正確に $F_0$ が測定できない．そこで測定光強度を下げるとどうしてもノイズが大きくなるが，そのような場合，応答速度を一番遅くすることにより，ノイズを抑えることができる．

このほか，測定系にファイバーオプティクスを使った系では，光源や測定フォトダイオードと，ファイバーオプティクスの先端の距離を変えることにより，測定光・励起光の強度やシグナルの出力を微調整することができる．これは，出力を微調整できないタイプの光源を使っているときに便利なテクニックである．また，分岐型のファイバーオプティクスを使って測定光と励起光を照射している場合，一本一本のファイバーは別々の光源につながっていることを認識する必要がある．ファイバーオプティクスを測定対象の葉に密着させた場合は，励起光があたる葉の部分と蛍光を観察する部分は厳密には一致しない．測定面積が小さい場合は，この影響を無視できないので，葉とファイバーオプティクスの先端の間に最低 5 mm 程度の隙間を空ける必要がある．

## 3.a.5　藻類とシアノバクテリアにおける測定

### 3.a.5.1　藻類とシアノバクテリアの呼吸と光合成

シアノバクテリアは原核生物であり，陸上植物のように細胞内小器官を持たず，呼吸系と光合成系は膜系によって隔てられていない．特に，電子伝達系においてはプラストキノンプールからシトクロム $b_6/f$ 複合体を経てシトクロム $c$ までを光合成と呼吸系で共有しているため，光合成系の電子伝達鎖の酸化還元状態は呼吸系の影響を直接受ける．暗所で呼吸系が動いているシアノバクテリアでは，定常状態においてはプラストキノンプールはかなり還元された状態にあり，これは，NDH 複合体の活性が末端酸化酵素の活性よりも高いとして解釈できる．真核藻類においては，光合成系は葉緑体に存在し，ミトコンドリアの呼吸系とは局在が異なるが，おそらくは葉緑体呼吸の存在により，シアノバクテリアの場合と同様，暗所ではプラストキノンプールが還元状態に保たれる．筆者の経験では，少なくとも緑藻，紅藻，そしてサンゴの共生藻である渦鞭毛藻などで，陸上植物とは異なり，シアノバクテリアと同様の，呼吸系の光合成系への影響を考慮に入れた解析が必要である．

### 3.a.5.2　ステート遷移と qN

藻類またはシアノバクテリアの細胞でクロロフィル蛍光測定を行うと，暗所で飽和パルスを当てても，そもそも蛍光の最大値が得られない(図 14)．その後に励起光を当てたときの方がむしろ蛍光強度が高くなる．従って，このまま強引に qN などを計算しようとすると，負の値になるなど意味をなさない．これは，上述のように暗所でも藻類やシアノバクテリアではプラストキノンプールが還元されているために qN が大きい(蛍光が小さい)ことによる[13]．この点が，暗所ではプラストキノンプールが酸化されて qN が 0 になる陸上植物とは全く異なる．しかも藻類やシアノバクテリアの qN は，陸上植物のようにプロトン濃度勾配による部分の寄与が大きくない．プロトン濃度勾配を反映する ATP/ADP 比は，シアノバクテリアの場合はまったく qN と相関を示さない．紅藻やシアノバクテリアの場合は，フィコビリソームから光

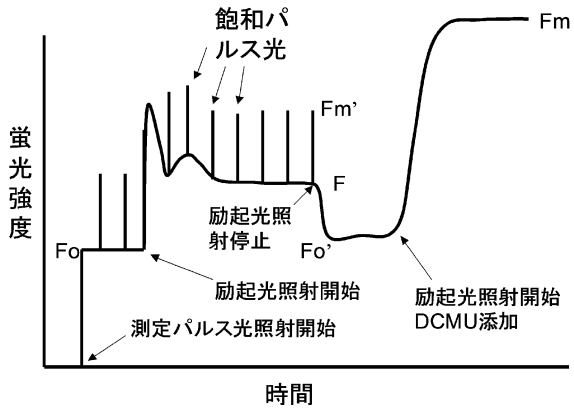



図 14：シアノバクテリアにおけるパルス変調蛍光測定例

化学系Ⅰへのエネルギー分配（ステート遷移）にともなう蛍光の消光が，qN のかなりの部分を占めるとされている．

3.a.1.3 でも述べたように，フィコビリソームから光化学系Ⅰへのエネルギー分配は DCMU を添加したときには完全に抑えられ(ステート 1)，系Ⅱからの蛍光が相対的に一番大きくなり，qN は 0 となる．従って，DCMU を添加した後にはじめて蛍光の最大値 Fm が得られることになる．通常の条件ではフィコビリソームから光化学系Ⅰへのエネルギー移動が大きいため，光化学系Ⅱの蛍光は消光され，その結果，qN は大きい値をとる．一方の光化学系がもう一方の光化学系より励起される条件下においても，プラストキノンプールは，酸化状態，もしくは還元状態に片寄る．光化学系Ⅰが選択的に励起されるような光が照射された場合はプラストキノンプールは酸化され(ステート 1)，逆に光化学系Ⅱが選択的に酸化されるような光が照射された場合はプラストキノンプールは還元される(ステート 2)．ステートの状態は，主にプラストキノンプールがどの程度還元されているかによって調節されると考えられる．ただし，プラストキノンの酸化還元を表すはずの qP とステート遷移の指標となる qN の間には必ずしも相関がなく，この理由はまだ解明されていない．フィコビリソームを持たない緑藻などにおいても，陸上植物に比較してステート遷移がクロロフィル蛍光に非常に大きな影響を与えるという点では紅藻やシアノバクテリアと同様である．

藻類やシアノバクテリアの場合，もう一点，測定上の問題となるのは，非光化学消光の誘導が極めて速いことである．陸上植物の場合，前に述べたように 0.8 s 程度の飽和パルス光の照射によって Fm ないしは Fm'を得ることができるが，藻類やシアノバクテリアの場合は，この 0.8 s の間にも非光化学消光がおこり，蛍光が減少してしまう[14]．従って，レコーダーなどのレスポンスの遅い記録機器で測定をしていると，蛍光を過小評価することになる．このため，電気信号としてそのままパソコンへ取り込む，データ保持回路を使用する，オシロスコープを使う，などの対策が必須となる．

### 3.a.5.3　光環境測定への応用

シアノバクテリアにおいては qN の励起光強度依存性は，興味深い性質を持つ．qN は，暗所では呼吸によるプラストキノンプールの還元のため，高い値となるが，励起光を徐々に強くしていくと光合成の光化学系Ⅰと系Ⅱが動き始め，そのバランスがとれる光強度までプラストキノンが酸化され，qN は低下する(図 15)．さらに励起光を強くしていくと，シトクロム $b_6/f$ 複合体でのプラストキノンの酸化が電子伝達の律速段階となるため，プラストキノンの還元が起こり，qN は再び上昇する．このように，qN は測定時の励起光強度に対して下に凸の曲線を取るが，qN が最小値となる光強度を，そのシアノバクテリアの生育光強度に対してプロットすると，非常によい相関が見られる[13]．つまり，シアノバクテリアでは，生育環境の光強度においてもっとも qN を小さくしており，言い換えるとエネルギーを無駄に熱に変える割合をもっとも小さくしていることになる．したがって，逆に，あるシアノバクテリアの qN の励起光強度依存性を測定し，その最小値を与える光強度を求めれば，そのシアノバクテリアが順化している光強度が求まることになる．野外において，あるシアノバクテリアがどのような光環境の中で生育しているかを推定することは通常困難が伴うが，このような方法を使えば，それを見積もることが可能になる．この方法はシアノバクテリア以外の藻類にも適用できると考えられる．

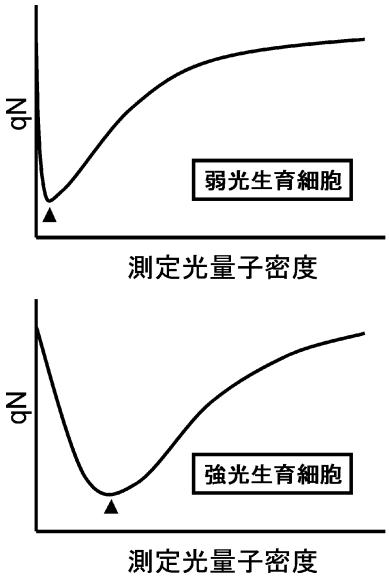


**図 15**：シアノバクテリアにおける非光化学消光の測定光強度依存性

### 3.a.5.4　オレンジカロテノイドタンパク質

従来，シアノバクテリアの非光化学消光は，ステート遷移で全てが説明されるとされていたが，近年，多くのシアノバクテリアにおいてオレンジカロテノイドタンパク質が蛍光の消光に寄与することが明らかとなった．オレンジカロテノイドタンパク質はカロテノイドを結合した水溶性のタンパク質で，フィコビリゾームを持つ生物に広く保存されている．シアノバクテリアの細胞の Fm'を連続的に測定している場合，暗所から弱光励起条件に細胞を移すと，ステート 2 からステート 1 への移行に

伴って，Fm’の増大が見られる．ここで，励起光を弱光から，クロロフィルのみを励起する（フィコビリソームを励起しない）青緑色光の強い光に切り替えた場合，シアノバクテリアではクロロフィルの9割近くは光化学系Ⅰに結合しているため，細胞はステート1に保たれるはずである．にもかかわらず，青緑色の強い光への励起光の切り替えに伴い，Fm’の減少が観察され，しかもこの減少はオレンジカロテノイドタンパク質の変異体では消失する[15]．従って，シアノバクテリアにおいては，ステート遷移の他に，オレンジカロテノイドタンパク質によるエネルギー放散系が働いていると考えられる．このオレンジカロテノイドタンパク質による熱放散系は，過剰な光による光阻害からの保護などに働いていると考えられるが，その詳細な機構についてはまだわかっていない．

## 3.a.6　パルス変調の吸収測定への応用

### 3.a.6.1　吸収測定の原理

上記のパルス変調による蛍光測定では，当てる光の波長とシグナルとして受け取る光の波長をずらすことによって蛍光を測定しているが，当てる光の波長と受け取る光の波長を同じにすれば，その波長での吸収・反射・散乱などを測定することができる．通常の吸収測定とは違って，パルス変調によりノイズが軽減されるので，葉による吸収の少ない赤外領域の光を使えば，生葉での吸収変化の測定が可能となる．一般の吸収測定でのように発光部と受光部の間に試料を入れて吸収を測定することも可能であるが(透過型，図16 a)，葉の場合は，海綿状組織などで光が散乱されるので，その散乱光をグラスファイバーを経て受光することにより，発光部と受光部を葉の同じ側においた状態でも，吸収を測定することができる(内部反射型，図16 b)．また，葉の内部での光の散乱が少ない場合には，葉の反対側に光の反射板をおいて測定することもできる（反射型，図16 c)．

通常の分光器とは違って，パルス変調を利用した吸収測定では，受光部で受け取った光の量がそのまま信号として取り出される．つまりシグナルは吸収ではなく，受光した光強度を反映する．ところが，分光セルに入れた試料と違って，葉では，光がどこを通ったかについては全くわからない．例えば，上記の反射型では葉をいったん通り抜けた光が受光部に戻るので光路はかなり長くなるが，内部反射型では，主に葉の細胞間隙で反射された光が戻るため光路は比較的短くなる．従って，吸収の絶対測定は不可能である．情報が得られるのは，吸収の変化についてのみである．また光路長に影響を与える組織構造の変化が無視できる場合にのみ測定結果は意味を持つことに注意する必要がある．

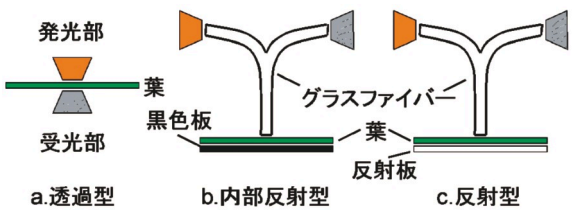



図16：パルス変調による吸収測定の方法

### 3.a.6.2　P 700の測定

P 700は光化学系Ⅰの反応中心クロロフィルで，酸化されると，700 nm付近に吸収減少を，750–850 nm付近にクロロフィルカチオンの生成に伴うブロードな吸収増加を示す．800 nm付近ではクロロフィルの吸収はほとんどないこと，酸化還元による吸収変化が知りたい情報であること，の2点から，P 700の測定は，パルス変調による測定に非常に適している[16]．実際の測定は，700 nm付近の近赤外光を照射したことによる820 nmの吸収変化を測定してP 700の相対量を見積もる．クロロフィルの吸収はこの測定光の波長領域では小さいため，蛍光測定の場合と異なり，測定パルスの強度や周波数は低く抑える必要はない．

光化学系Ⅰが吸収する近赤外光の照射によってP 700が酸化されると820 nm付近の吸収は増加するので，受光部に入る光量は減少する．この光量の変化を吸収変化に換算するには以下のようにする．

まず，試料に入る前の光量をIo，試料を通過したあとの光量をI，試料が吸収変化を起こしたあとの光量をI+ΔIとする．ある関数$y=f(x)$において，yの小さな変化Δyは，xの小さな変化Δxと$f(x)$の微分値(つまり，関数の傾き）である$f'(x)$を用いて，

$$\Delta y=\Delta x\cdot f'(x) \qquad (25)$$

と表すことができる．ただし，この式が成り立つのは，Δxもしくは Δyが充分小さいときである．次に，吸収Aは透過率Tを用いて

$$A=-\log(T) \qquad (26)$$

なので，小さな吸収変化ΔAは，$\log(x)$の導関数が$\log(e)/x$であることと上の式を考え合わせると

$$\Delta A=-0.434\Delta T/(1/T) \qquad (27)$$

となる．吸光度TはI/Ioなので，これを上の式に代入すると

$$\Delta A=-0.434(\Delta I/Io)/(I/Io)=-0.434\Delta I/I \quad (28)$$

となる．つまり P-700 の酸化に伴う光量の変化量を，吸収変化を起こす前の光量で割れば，吸収変化量になることがわかる．ΔI そのままでは吸収変化（ΔA）ではないこと，ΔI から ΔA への換算は ΔI が Io に比べて充分小さいときにのみ成り立つことに注意する必要がある．

### 3.a.6.3　系 I の実効量子収率

光化学系 II のある光強度における実効量子収率（$\Phi_{II}$）は，その光強度における反応中心が open である割合 qP と open な光化学系 II の量子収率 Fv'/Fm' を掛け合わせることで求めることができる（3.a.3.4 参照）．同様な実効量子収率は光化学系 I についても定義できるはずである．反応中心が open な割合は，P 700 に関しては，[P 700]/([P 700$^+$]+[P 700])で表すことができる．open な光化学系 I の量子収率を直接測定することはできないが，一般に，光化学系 I の量子収率は条件によって変化しないとされているので，もしそれが正しければ，実効量子収率は open な反応中心の割合に比例するはずである．このような考え方で，光化学系 I についてもその量子収率 $\Phi_I$ を定義する場合がある．

実際に P 700 による吸収変化を測定すると，図 17 のようになる．暗所では P 700 は還元状態と考えられる．ここに赤外光を当てると P 700 のほとんどが酸化され，残ったわずかな還元型の P 700 も飽和パルス光（SP）を当てることにより酸化される．従って，図の a が P 700 の全量を示すと考えることができる．完全酸化の直後に，一過的な P 700 の還元が見られるが，これは飽和パルス光によって駆動される光化学系 II からの電子が P 700 を還元することによる．一方，一定強度の励起光（白色光）を当てた場合，P 700 は酸化型と還元型がある値で平衡状態になる（図の c）．ここで，飽和光を当てるとほとんどの P 700 が酸化される（図の b の部分）が，一部は還元型で残る．

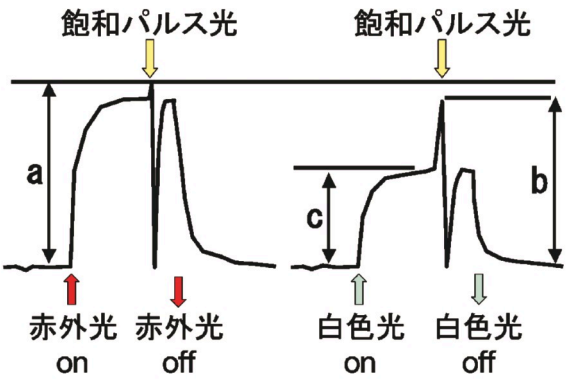



図 17：パルス変調による P 700 の酸化還元の測定例

この解釈として，系 I の電子受容体が励起光によって一部還元されているためにその一部では電荷分離が起こらず（もしくは電荷分離が起こっても電荷再結合（逆反応）が速く）P 700 を完全に酸化することができない，との考え方がある[17]．このような考え方にたてば，図の a と b の差の部分は，P 700 は還元型であっても電荷分離は起こらないので，open な光化学系 I の割合は (b−c)/a になり，これを $\Phi_I$ と定義する．

ただし，a と b の差の部分に関しては別の解釈も可能である．一般に，飽和パルス光源の光強度の立ち上がりには時間がかかるため，飽和パルス光が本当の意味で飽和光になるまでには一定の時間がかかる．飽和パルス光源は当然光化学系 II も励起するので，この時間内に光化学系 II からの電子が P 700 まで到達してしまうと，P 700 を完全に酸化することは難しくなる．このことは飽和連続白色光を当てた場合には P 700 が一部還元されることからもわかる．赤外光を当てているときには，ほとんどの P 700 があらかじめ酸化されているので飽和パルス光源により P 700 が完全酸化されるが，励起光照射時には，還元されている P 700 が多いため，飽和パルス光が P 700 を完全に酸化する前に光化学系 II からの電子が P 700 を還元してしまい，図の a と b の差の部分については P 700 を酸化しきれない，という解釈も成り立つ．この場合は，単に技術的な問題のために図の a の部分を酸化できないだけなので，open な光化学系 I の割合は (a−c)/a となる．

実際には実験の条件によってもどちらの考え方が正しいかは異なるようである．特に飽和パルス光の特性が大きく影響を与える．もともと $\Phi_I$ を定義した論文では飽和パルス光にメカニカルシャッターを組み合わせることにより光強度の立ち上がりを速くしているのでおそらく問題はないが，その後この方法を使った論文ではそのような配慮をしていないケースも多く，技術的な問題が大きく効いている可能性がある．図の a と b の差の部分の解釈として，上記の 2 つのケースのうちどちらが正しいかを見分けるには，暗所で飽和パルス光を当てたときに P 700 が全量酸化されるかどうかを見ればよいだろう．電子受容体の還元が図の a の部分の原因であれば，暗所では電子受容体は酸化されているはずなので P 700 は全量酸化されるはずであるし，光化学系 II からの電子が原因であれば，暗所ではもともと P 700 がほとんど還元されているので，P 700 は完全酸化されないはずである．いずれにせよ，このように定義された $\Phi_I$ は，実効量子収率そのものではなく，open な系 I の割合を示したものであ

ることに注意する必要がある．

## 3.a.7　参考となる総説など

最後に，クロロフィル蛍光の測定にあたって参考となる総説などを若干紹介しておく．

単行本としては，Papageorgiou と Govindjee の編集による〝Chlorophyll a Fluorescence: A Signature of Photosynthesis〟(2004)が詳しい[18]．また，Yunus, Pathre, Mohanty による編集の〝Probing Photosynthesis〟(2000) にも蛍光関係の総説が載っている[19]．その他，Austrarian Jouranl of Plant Physiology の 22 号 (1995) は蛍光の特集号になっており，数多くの総説が掲載されていて参考になる．特に，この号の最初に載っている Govindjee の総説[2] は，古い歴史から手際よくクロロフィル蛍光の紹介がされていて楽しい．この他，蛍光測定の素人向けの実際の測定方法の解説としては Ecological Studies というシリーズの中の〝Ecophysiology of Photosynthesis〟の中の第 3 章〝Chlorophyll Fluorescence as a Nonintrusive Indicator for Rapid Assessment of In Vitro Photosynthesis〟が極めてわかりやすい[20]．

クロロフィル蛍光の初歩全般を扱った総説としては，Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.に Krause と Weis が 1991 年に書いた〝Chlorophyll Fluorescence and Photosynthesis: The Basics〟が平易でわかりやすい[1]．日本語のものとしては，データの解釈方法について筆者が光合成研究会報に書いたもの（パルス変調クロロフィル蛍光測定におけるデータの解釈，2005 年）がある[21]．

この他，数多くの総説が出されているが，最近の総説としては Baker による〝Chlorophyll Fluorescence: A Probe of Photosynthesis In Vivo〟が 2008 年に Annu. Rev. Plant Biol.に出ている[22] ので，そこに紹介される文献と共に参考にして欲しい．

## 参考文献


1）G. H. Krause & E. Weis, Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol. **42** (1991) P.313.
2）Govindjee, Aust. J. Plant Physiol. **22** (1995) P.131.
3）B. J. Strasser & R. J. Strasser, Photosynthesis: from Light to Biosphere, vol. V, ed. P. Mathis, Dordrecht, Kluwer, 1995, p.977.
4）K. Oxborough & N. R. Baker, Photosynth. Res. **54** (1997) P.135.
5）W. P. Quick & M. Stitt, Biochim. Biophys. Acta **977** (1989) P.287.
6）D. M. Kramer, G. Johnson, O. Kiirats & G. E. Edwards, Photosynth. Res. **79** (2004) P.209.
7）J. Lavergne & H. W. Trissl, Biophys. J. **68** (1995) P. 2474.
8）M. Kitajima & W. L. Butler, Biochim. Biophys. Acta **376** (1975) P.105.
9）B. Genty, J.-M. Briantais & N. R. Baker, Biochim. Biophys. Acta **990** (1989) P.87.
10）B. Demmig-Adams, W. W. Adams III, D. H. Barker, B. A. Logan, D. R. Bowling & A. S. Verhoeven, Physiologia Plantarum, **98** (1996) P.253.
11）M. C. Kato, K. Hikosaka, N. HIrotsu, A. Makino & T. Hirose, Plant Cell Physiol., **44** (2003) P.318.
12）L. Hendrickson, R. T. Furbank & W. S. Chow, Photosynth. Res. **82** (2004) P.73.
13）D. Campbell & G. Öquist, Plant Physiology, **111** (1996) P.1293.
14）U. Schreiber, T. Endo, H. Mi & K. Asada, Plant Cell Physiol., **36** (1995) P.873.
15）D. Kirilovsky, Photosynth. Res. **93** (2007) P.7.
16）U. Schreiber, C. Klughammer & C. Neubauer, Z. Naturforsch. C **43** (1988) P.686.
17）C. Klughammer & U. Schreiber, Planta **192** (1994) P. 261.
18）G. C. Papageorgiou & Govindjee (ed.), Chlorophyll *a* Fluorescence: A Signature of Photosynthesis, Springer, 2004.
19）M. Yunus, U. Pathre & P. Mohanty (ed.), Probing Photosynthesis: Mechanisms, Regulation, and Adaptation, Taylor & Francis, 2000.
20）U. Schreiber, W. Bilger & C. Neubauer, Ecophysiology of Photosynthesis, ed. C. D. Schulze & M. M. Caldwell, Springer-Verlag, 1994, p.45.
21）園池公毅，日本光合成研究会会報 **42**（2005）p.7.
22）N. R. Baker, Annu. Rev. Plant Biol. **59** (2008) P.89.

# 3．パルス変調蛍光

## b．PAMおよびガス交換測定器を用いた，蛍光および二酸化炭素同時測定による植物の光エネルギー利用の評価 ── ガス交換解析とクロロフィル蛍光の同時測定 ──

牧野　　周[1)]

光合成ガス交換解析とクロロフィル蛍光解析による測定技術は，植物の葉の光合成能力を非破壊的に評価できる技術としてそれぞれ別々に開発されてきたものであり，現在，植物の光合成を評価するもっとも有力な測定技術の一つである．ここでは，両手法の同時測定解析得られるパラメータを紹介しその理論と問題点および測定上の注意事項について解説する．

## Simultaneous measurements of gas exchange and chlorophyll fluorescence

Amane Makino

Simultaneous measurements of gas exchange and chlorophyll fluorescence have made it possible to evaluate photosynthetic capacity from the electron flux in PS II to carbon assimilation and photorespiration at the level of an intact leaf.　I introduce theory and principal of this technique and describe the technical problems on the measurements.

光合成ガス交換とクロロフィル蛍光の同時解析は，研究者独自の考案により1990年代頃より報告されている．代表的なものとしては，Genty ら[1)]の PSII の量子収率からの電子伝達速度算出の正当性の確認，Di Marco ら[2)]や Harley ら[3)]の葉肉細胞における $CO_2$ 拡散伝導度の評価法，Miyake & Yokota[4)]の water-water cycle などのオルターナティブ電子伝達活性の評価等に用いられてきた．いずれも，それらのパラメータを評価するのに重要な情報を与えたが，精度高く定量的に評価すると言う意味では限界がある手法でもある．

しかし，ガス交換とクロロフィル蛍光を同時測定することにより，原理的には PSII からの電子伝達活性への光の利用効率から Rubisco サイトでの $CO_2$ 固定活性までの反応が生葉レベルで定量的に，しかも非破壊的に比較考察できる解析手法であるので，光合成全体の反応の調節機構やポテンシャルとしての総合能力を評価するにはもっとも有力な手法であることは間違いない．

ここでは，Miyake & Yokata[4)]および Makino ら[5)]の報告に従い，ガス交換とクロロフィル蛍光の同時解析によって評価可能なパラメータを紹介し，理論と問題点および測定上の注意事項について解説する．なお，本書では，カス交換解析の技術は，(2)1．にて，クロロフィル蛍光解析の技術は(4)2 a および(4)3 a．にて紹介されるので，それらの詳細な原理や測定法については割愛する．

1）東北大学大学院農学研究科応用生命科学専攻

### 3.b.1　同時測定の原理と理論

光合成ガス交換法により測定される光合成速度（$CO_2$ 交換速度）から，Farquhar らの光合成モデル理論［詳細は(2)1 a］に基づくと，その測定された光合成速度を説明するリニア電子伝達速度が算出可能となる（Jg，単位は通常葉面積当たりで $\mu$mol e $m^{-2}s^{-1}$）．

$$Jg=(A+Rd)(4Cc+8\Gamma^*)/(Cc-\Gamma^*) \qquad (1)$$

A はガス交換で測定される光合成速度（光呼吸速度を含めた光合成速度を意味する，単位は $\mu$mol $CO_2m^{-2}s^{-1}$），Rd は測定条件の光強度下における呼吸速度（単位は $\mu$mol $CO_2m^{-2}s^{-1}$），Cc は葉緑体内での $CO_2$ 分圧（単位は通常 Pa），$\Gamma^*$ は光合成速度と光呼吸速度間の $CO_2$ 補償点で，Rubisco の酵素的キネティックパーラメータであらわされる．

$$\Gamma^*=0.5\,Vo\,Kc/Vc\,Ko \qquad (2)$$

Vc と Vo は Rubisco のカルボキシラーゼ活性とオキシゲナーゼ活性それぞれの Vmax（単位はともに mol $mol^{-1}s^{-1}$）で Kc と Ko はそれぞれ Rubisco のカルボキ

シラーゼ活性の $CO_2$ に対する Km（単位は通常 Pa）とオキシゲナーゼ活性に対する Km（単位は通常 Pa）である．

一方，同時測定したクロロフィル蛍光解析から測定された PSII の量子収率より Genty ら[1] の式を用いて PSII での電子伝達速度が算出される（Jf，単位は $\mu$mol e $m^{-2}$ $s^{-1}$）．

$$Jf = \alpha I \Delta F/Fm' \quad (3)$$

ΔF/Fm' は PSII の量子収率，I は光合成ガス交換クロロフィル蛍光の同時測定を行っている時の葉の表面での光強度（単位は $\mu$mol quanta $m^{-2}s^{-1}$），$\alpha$ はその光測定条件で PSII が吸収する光強度の分配割合を意味し，Genty らの報告[1] に基づき，弱光（100 $\mu$mol quanta $m^{-2}s^{-1}$ 程度），低 $O_2$ 分圧（1 kPa 程度），高 $CO_2$ 分圧（100 Pa 程度）の測定条件では Jg は Jf に等しいと仮定して算出する．通常は 0.4 から 0.45 くらいの値が得られる．

このようにしてクロロフィル蛍光解析により求めた PSII の電子伝達速度はガス交換解析で求めた電子伝達速度 Jg を上回ることが多く，その差がオルターナティブな電子伝達速度 Ja とみなされる．

$$Ja = Jf - Jg \quad (4)$$

ここで算出される Ja は water-water cycle の電子伝達活性が高い場合にはプラス側の値に，PSI サイクリック電子伝達活性が高い場合にはマイナス側の値に振れる．

## 3.b.2　同時測定の理論上の問題点

ガス交換速度より電子伝達活性を算出する式(1)において，いくつかの問題点がある．まず，呼吸速度 Rd の算出である．呼吸速度は明暗の条件で異なることが知られている（明所呼吸の方が暗所呼吸より小さい）ので，暗所で測定された呼吸速度をここに代入することは正しくない．Brooks & Farquhar は光強度を変えて測定される見かけ上の $CO_2$ 補償点に違いから Rd を算出する方法を報告している[6]．理論的には正しい算出法であるとされているが，実験誤差を伴いやすい．Cc の算出も簡単ではない．これについては(2)1 b.c において詳しく解説されるのでそちらを参照されたい．また，$\Gamma^*$ の算出も無視でき得ない誤差を伴う．$\Gamma^*$ の算出も Brooks & Farquhar の報告[6] に従い可能であるが，上でも述べたように誤差を生じやすい．彼らはホンレン草を用い 25℃で 4.27 Pa という値を見出し，別に Rubisco の酵素キネティックより求めた Jordan & Ogren[7] の値と一致していることを強調している［式(2)より算出］．しかし，Jordan & Ogren の報告でも Ko の測定に大きな問題点がある．また，Rubisco のキネティクス値自身文献により値が大きく異なる（例えば von Caemmerer & Quick[8] を参照）ので，正しい値の採用が難しい．

また，式(1)のもっとも大きな問題点は，測定される $CO_2$ 交換速度がすべてリニアな電子伝達活性によって説明される光合成であることが前提となっており，サイクリック電子伝達活性の関与が考慮されていない点である．近年，いろいろな環境条件でサイクリック電子伝達活性が光合成全体の反応に貢献していることが明らかになってきており，解釈には十分な注意が必要となる．上でも述べたように，サイクリック電子伝達の関与は Ja をマイナス側に振る要因となる．

クロロフィル蛍光解析による PSII の量子収率より電子伝達活性を算出する式(3)においては，測定条件の光条件で PSII が吸収する光強度割合 $\alpha$ の算出方法に問題点がある．$\alpha$ は Genty らの報告[1] に基づき，弱光条件で光呼吸を抑えた低 $O_2$ 分圧/高 $CO_2$ 分圧下ではオルターナティブの電子伝達は生じない前提で算出している．しかし，低 $O_2$ 分圧下では，サイクリック電子伝達活性が促進されるとの報告もある[5,9]．また，光強度の上昇等に伴いこの $\alpha$ 値が変化する可能性も否定できない．

以上のように，ガス交換とクロロフィル蛍光を同時測定は，光合成全体の反応の調節機構やポテンシャルとしての総合能力を評価する非常に有力な手法ではあるが，いくつかの問題点を含む解析法であることを認識しなければならない．

## 3.b.3　同時測定の注意事項

光合成測定を行う場合，葉面での光強度，温度，$CO_2$ 分圧，$O_2$ 分圧および湿度が厳密に制御可能な装置が備わっていることと，その測定に耐え得る厳密な同化箱装置を作製されていることが必要不可欠であることは言うまでもない．また，同化箱装置内では葉面における $CO_2$ の拡散境界面抵抗が測定値に影響を及ぼさないように十分な風速が与えられること，同化箱内外のガスの巻き込みや漏れが生じない工夫も必要である．一般には，ファンが内蔵された同化箱装置が用いられ，同化箱内の空気圧が外気に対して多少陽圧になるような設計がされる場合が多い．例えば，Sharkey ら考案した装置[10] では，論文には記載されていないが，同化箱にはマノメーターがセットされており，外気に対して 1％ほど陽圧が保たれることが確認できるようになっている．また，彼らは Farqu-

har の式を用いて，光合成速度を計算する時も大気圧プラス１％の補正を行っている．

近年では，米国の Li-Cor 社製のポータブル光合成装置 LI-6400 が広く普及している．この装置では上記の条件をおおよそ満足するものである．しかし，同化箱内がどのくらい陽圧にされているかは公表されていない．また，低 $CO_2$ 分圧条件での外気 $CO_2$ の巻き込みや高 $CO_2$ 条件での $CO_2$ の漏れも確認されており，装置そのものを包み込むエアバッグを併用して，外気との $CO_2$ 分圧差を可能な限り小さくして測定することを推奨する報告[11]もある．いずれにせよ，これらの $CO_2$ の巻き込みや漏れがないことの確認は，熱処理した葉を同化箱にはさみ，$CO_2$ フリー条件や 100 Pa 以上の高 $CO_2$ 分圧ガスを同化箱に流し込み，同化箱流入前後の空気の $CO_2$ 分圧に差が生じないことでチェックできる．

ガス交換とクロロフィル蛍光の同時測定でも同化箱の工夫を凝らす必要がある．なぜならば，ガス交換はなるべく同化箱前後での $CO_2$ 分圧差を大きくすることが望まれるため，ある程度測定面積を確保した同化箱が必要となる．例えば，Li-Cor 社の LI-6400 では標準タイプとして 6 $cm^2$ の同化箱が設定されている．Walz 社から販売されているポータブル装置 GFS-3000 でも同等の測定面積が確保されている．しかしながら，クロロフィル蛍光測定では測定光が葉面に均一に照射されることをが厳密に要求されるので，比較的小さなスポット測定で行われる（通常は 1 $cm^2$ 程度）．すなわち，同時測定を行う場合は，大きな面積に厳密に均一な光強度の照射が求められる．Li-Cor 社から販売された最初の同時測定装置 LI-6400R は販売直後に一旦製造中止となり，現行のモデルでは同化箱面積が 2 $cm^2$ まで小型化された．おそらく，初期型のものでは，測定光の均一性に問題があり，改良が加えられたものと想像している．しかし，同化箱の小型化はやはり，同化箱前後の $CO_2$ 分圧差を小さくするためカス交換測定の精度を下げるものであった．例えば，この装置を用いての弱光条件や各種ストレス条件での光合成速度解析は測定される絶対速度が低いため無視でき得ない誤差を生じさせる．また，例えば，上述の $\alpha$ 値の正確な算出も困難となる．最近，Walz 社から測定面積が 8 $cm^2$ 確保されたクロロフィル蛍光同時測定ユニット 3055-FL が販売されたが，残念ながら，筆者はその使用実績の情報を得ていない．

自作する場合は，さらに同化箱内でクロロフィル蛍光測定のためのファイバーが光源からの影を落とさないような工夫も必要となる．リングライトのように同化箱の周囲から均一に光照射ができ，ライト穴の中央から蛍光測定用のファイバーが組み込めるような装置が良いであろう．筆者らは日本ピー・アイ社の COLD SPOT スクエアリングライトを使い，ファイバーからの影が同化箱に落ちないように作製した装置で解析を進めている[12]．

## 参考文献


1）B. Genty, J. Briantais & N. Baker, Biochim. Biophys. Acta **990** (1989) p.87
2）G. Di Marco, F. Manes, D. Tricoli & E. Vitale, J. Plant Physiol. **136** (1990) p.538
3）P. C. Harley, F. Loreto, G. Di Marco & T. D. Sharkey, Plant Physiol. **98** (1992) p.1429
4）C. Miyake & A. Yokota, Plant Cell Physiol. **41** (2000) p.335
5）A. Makino, C. Miyake & A. Yokota, Plant Cell Physiol. **43** (2002) p.1017
6）A. Brooks & G. D. Farquhar, Planta **165** (1985) p.397
7）D. B. Jordan & W. L. Ogren, Planta **161** (1984) p.308
8）S. von Caemmerer & W. P. Quick, Photosynthesis: Physiology and Metabolism, ed. R. C. Leegood, T. D. Sharkey & S. von Caemmerer Kluwer, Dordrecht, The Netherlands, 2000, p.85
9）T. Joët, L. Cournac, G. Peltier & M. Havaux, Plant Physiol. **128** (2002) p.760
10）T. D. Sharkey, Plant Physiol. **78** (1985) p.71
11）M. Rodegbiero, U. Niinemets & A. Cescatti, Plant Cell Environ. **30** (2007) p.1006
12）N. Hirotsu, A. Makino, S. Yokota & T. Mae, Plant Cell Physiol. **46** (2005) p.1377

# 3．パルス変調蛍光
## c．光化学系Ⅰサイクリック電子伝達の活性測定

宗景　ゆり[1)]

光化学系Ⅰサイクリック電子伝達では，光化学系Ⅰを通過した電子は，プラストキノンへ戻され，直鎖電子伝達経路を経由して再び光化学系Ⅰへ渡される．本章ではクロロフィル蛍光測定やP700の酸化キネティックス測定から光化学系Ⅰサイクリック活性を検出する方法を紹介する．

## Measurement of PSI cyclic electron transport activity

Yuri Munekage

In cyclic electron transport around photosystem I, electrons are donated to plastoquinone from acceptor of photosystem I. In this chapter, I introduce methods for evaluating cyclic electron transport activity from chlorophyll fluorescence measurement or oxidation kinetics of P700 measurement.

### 3.c.1　はじめに

光化学系Ⅰサイクリック電子伝達は，光化学系Ⅰを通過した電子がプラストキノンへ戻される電子伝達で，戻ってきた電子はシトクロム $b_6f$ 複合体，プラストシアニンを経由して再び光化学系Ⅰへ渡される．この経路には，葉緑体NAD(P)H dehydrogenase（NDH）複合体を介する経路と，アンチマイシンAによって阻害されるFerredoxin-plastoquinone reductase（FQR）経路の二つの経路があることが知られている．これらの経路の詳細や生理的意義の解明は長い間手つかずのままであったが，近年これらの電子伝達に関わる分子の解析が飛躍的に進んでいる．定量的なサイクリック電子伝達活性測定法は未だ確立されていないが，ここではクロロフィル蛍光測定やP700の酸化キネティックス測定から間接的にサイクリック活性を検出する方法を紹介する．

### 3.c.2　*in vitro* プラストキノン還元測定

常温でのクロロフィル蛍光は光化学系IIから発せられ，光化学系IIのキノン型電子受容体である $Q_A$ やプラストキノンプールの還元状態を反映する．このため測定光下で光化学系IIを励起し，サイクリック活性によるプラストキノンの還元を，クロロフィル蛍光の上昇として検出することができる．*in vitro* の系では，単離チラコイド膜に過剰量のNADPHおよびフェレドキシンを加えることで，NADPHから電子がチラコイド膜上のFNRの逆反応によりフェレドキシンにわたり，サイクリック活性によってプラストキノンが還元される様子がみられる[1),2)]．

測定バッファー（7 mM $MgCl_2$，1 mM $MnCl_2$，2 mM EDTA，30 mM KCl，0.25 mM $KH_2PO_4$，50 mM HEPES pH 7.6）に低張液で破砕させた単離葉緑体または単離チラコイド膜（10 $\mu$g Chl $ml^{-1}$）を入れスターラーで攪拌する．測定光（1.0 $\mu$mol photons$m^{-2}s^{-1}$）を照射し0.25 mM NADPH続いて，5 $\mu$Mフェレドキシンを加える．図1[3)]のようにシロイヌナズナ野生株（WT）から単離した破砕葉緑体ではフェレドキシンを添加したときにクロロフィル蛍光の上昇がみられる．アンチマイシンA（2 $\mu$M）を加えた破砕葉緑体ではクロロフィル蛍光の上昇速度が著しく遅くなる．また *pgr5* 変異株[4)]，NDH複合体を欠く *crr2-2* 変異株[5)]から単離した破砕葉緑体ではクロロフィル蛍光上昇速度が野生株より遅い．*pgr5* 変異株の破砕葉緑体にアンチマイシンAを加えたときには変化が見られないが，*crr2-2* 変異株の破砕葉緑体に

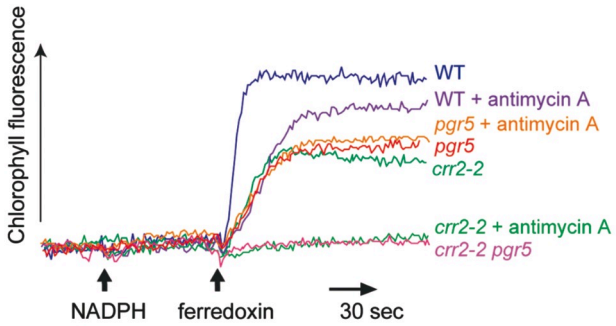



図1：*in vitro* プラストキノン還元[3)]

1）奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科

アンチマイシンAを加えたときにはクロロフィル蛍光の上昇がほとんどみられなくなる．また *pgr5 crr2-2* 二重変異株から単離した破砕葉緑体でもクロロフィル蛍光の上昇がほとんどみられない．このように *in vitro* プラストキノン還元測定ではNDHに依存する経路，FQRに依存する経路の両方の活性を検出できる．

### 3.c.3　NDH活性に依存した一過的クロロフィル蛍光の上昇測定

光合成誘導光を消したときに測定光照射下でクロロフィル蛍光が一過的に少し上昇し山を描いて下がる様子が見られる．これは，光合成中に蓄えられた還元力により，暗黒下でプラストキノンが還元されたことを反映している．NDHに依存するこのクロロフィル蛍光の上昇は⊿*ndhB* 葉緑体形質転換タバコの解析より見出された[6]．

図2はシロイヌナズナの生葉のNDH活性を測定したものである[3]．暗順化させた葉に測定光（ML）を照射しクロロフィル蛍光のFoレベルを確認する．飽和光パルス（800 ms；SF）を照射後，光合成誘導光（50 $\mu$mol photons $m^{-2}s^{-1}$；AL）を5分間照射する．光合成誘導光を消した時，野生株（WT）では，クロロフィル蛍光が一旦Foレベルまで下がり，次に一過的に上昇した後再びFoレベルまで下がる．NDH複合体を欠損した *crr2-2* 変異株ではクロロフィル蛍光の一過的上昇がみられないが，*pgr5* 変異株では野生株と変わらずクロロフィル蛍光の一過的上昇がみられる．このようにクロロフィル蛍光の一過的上昇はNDH経路のみに依存していることがわかる．光合成誘導光（AL）が強すぎるとFoのクエンチングが起き，クロロフィル蛍光の一過的上昇がみられなくなるため，光合成誘導光は生育光強度またはそれより弱い光を用いる．

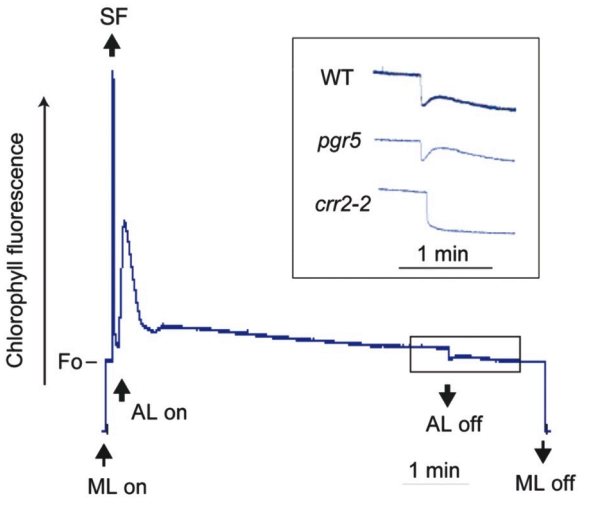


図2：NDH活性に依存した一過的クロロフィル蛍光の上昇[3]

### 3.c.4　P700酸化還元測定

光化学系Iサイクリック電子伝達によってプラストキノンに戻された電子は，再びシトクロム $b_6f$ 複合体，プラストシアニンを経由して光化学系Iに渡される．光化学系Iの反応中心P700の酸化還元に伴う820 nm付近の吸光度変化をモニターすることで，サイクリック活性によって光化学系Iに渡される電子の量を評価することができる．

Schreiberらは，光合成誘導光照射後に赤外光照射下でP700酸化速度を測定し，ストロマに蓄えられた電子がサイクリック活性によってP700に渡される量を見積もっている[7]．図3は夾竹桃の生葉でのP700酸化速度を調べたものである．まず，電子伝達系内の電子のプールサイズを測定する（図3A）．葉に赤外光（>700 nm，6.8 W $m^{-2}$；FR）を20秒間照射してP700酸化させ，電子伝達系内の電子を除去する．次にFR照射下でキセノンランプ（1,500 W $m^{-2}$）を使って，一励起エネルギーを与えるsingle-turnover light（a half peak width 14 $\mu$s；ST）を照射する．P700は光化学系IIからの電子により還元されるが，すぐにFRによって酸化される．続いて電子伝達系内をすべて還元させるためにキセノンランプ（1,500 W $m^{-2}$）を使ってmultiple-turnover light（50 ms；MT）を照射する．P700はほとんど完全に還元された後，再び酸化されるが，ST照射後よりもゆっくりと酸化される．図の水色で示した部分［ST］を青色の部分［MT］で割るとP700あたりの電子伝達系内の電子のプールサイズが得られる．

今度はサイクリック活性を見積もるため，FR照射下

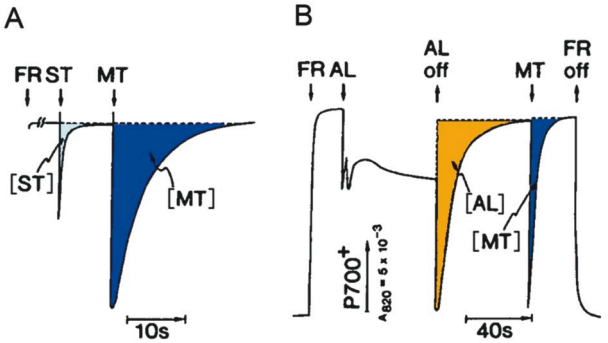


図3：Schreiberらによる P700酸化速度を利用したサイクリック電子伝達活性の見積もり[7]

で光合成誘導光（AL）を照射する（図3 B）．ALを消したあとP 700は一旦，光化学系IIから来る電子によって還元されるが，その後FRによりゆっくりと酸化される．続いてMTを照射する．AL照射後のP 700酸化速度はMT照射後の酸化速度よりも非常に遅くなっており，電子伝達系内の電子より多くの電子がP 700に渡されていること，つまりストロマに蓄えられた電子がサイクリック活性によって電子伝達系に入ってきてP 700に渡されていることを示している．オレンジ色で示した部分[AL]がAL照射下でストロマに蓄積された電子がサイクリック活性によってP 700に渡された量を示している．従って，P 700あたりのストロマから戻ってくる電子のプールサイズは

$$(\text{MT-area}/\text{ST-area})\times\{(\text{AL-area}/\text{MT-area})-1\}$$

と見積もられる．

Shikanaiらは比較的強い測定光下でFRを照射したときのP 700酸化速度からPGR5に依存するサイクリック活性を評価している[8]．図4は測定光（1.3 $\mu$mol photons $m^{-2}s^{-1}$）照射下でFR（>700 nm，36 $Wm^{-2}$）を照射したときのP 700の酸化速度を，シロイヌナズナ野生株，*pgr5*変異株，カリフラワーモザイクウイルス35Sプロモータでドライブした PGR5過剰発現体（*35S::PGR5*）間で比較したものである．*pgr5*変異株ではFR照射下での酸化速度が野生株よりも速くなっており，光化学系Iに渡される電子の数が少ないことがわかる．逆にPGR5が約5倍発現している*35S::PGR5*では野生株よりも酸化速度が遅くなっており光化学系Iに渡される電子の数が多くなっていることがわかる．

Joliotらは暗順化した植物を光順化させる過程でP 700の酸化速度が変化していく様子をとらえ，$CO_2$固定反応が抑制される環境下で最大活性をもっていた光化学系Iサイクリック電子伝達が$CO_2$固定反応の活性化に伴って低下し，直線的電子伝達に置き換わることを報告している[9]．図5はFR照射下でのP 700酸化キネティックスを示している．curve 1は緑色光を10分間以上照射して光順化させ2分間暗処理した葉，curve 2は暗順化させた葉のP 700酸化キネティックスである．暗順化させた葉では光順化させた葉よりもP 700酸化速度は遅くなっている．P 700の酸化が遅くなる条件下（curve 2）でもチラコイド膜内外に電場が形成されることから，電子伝達が継続して起こっていると考えられ，光化学系Iサイクリック電子伝達によってP 700に電子が渡されるため酸化速度が遅くなると解釈される．またcurve 2は二相性のキネティックスを描く．速いphaseはストロマの電子受容体（おそらく$NADP^+$）へ電子が送られていることを示している．curve 3は暗順化させた葉に緑色飽和光を200ミリ秒間照射し5秒間暗処理した葉のP 700酸化キネティックスである．この短時間の飽和光照射は，$CO_2$固定反応を活性化しないが電子供与体プールを完全に還元するため，curve 2でみられた速いphaseは消え，P 700の酸化速度はもっとも遅くなっている．P 700酸化速度は緑色飽和光の照射時間が長くなると次第にはやくなり，完全に光順化させたcurve 1と同様のキネティックスを示すようになる．このcurve 1はmethyl viologen存在下でのP 700キネティックスと変わらないことから，直線的電子伝達によるP 700酸化速度であることが示されている．このように，暗順化させた葉では光化学系Iサイクリック電子伝達が最大活性をもち，それが光照射により直線的電子伝達に置き換わる様子がわかる．この測定方法で*pgr5*や*crr4-2 pgr5*（*crr4-2*；NDH複合体量が12.5-25%に減少している変

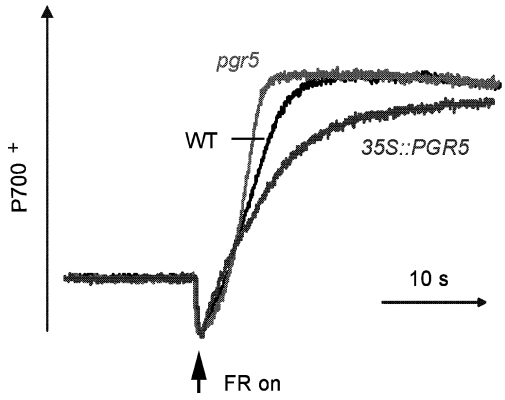



図4：Shikanaiらによる P 700酸化速度を利用したサイクリック電子伝達活性の評価[8]

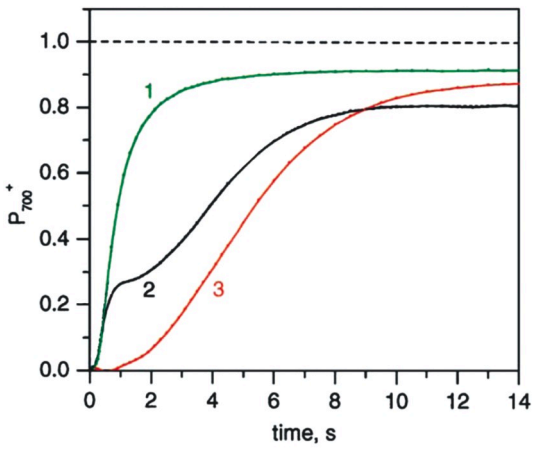



図5：Joliotらによる P 700酸化速度の測定を利用した暗順化および光順化した葉におけるサイクリック電子伝達活性の見積もり[9]

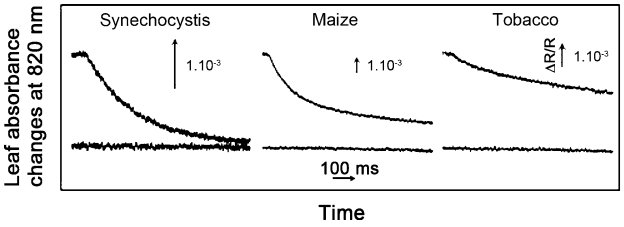



**図 6**：赤外光照射後の暗黒下での P 700 再還元速度[11)]

異株[3)] の P 700 酸化キネティックスを調べると，暗順化した葉，また緑色飽和光を 200 ミリ秒間照射した葉の P 700 の酸化速度は野生株よりも速くなっているが，光順化させた葉と比較すると非常に遅く，*pgr5* や *crr4-2 pgr5* においても光化学系 I サイクリック電子伝達活性が残存すると報告されている[10)]．

P 700 再還元速度もまた光化学系 I サイクリック電子伝達活性を反映することが報告されている[11)12)]．図 6 は赤外光を照射し P 700 を酸化させた後，赤外光を消し暗黒下で P 700 再還元速度を測定したものである[11)]．Synecocystis や $C_4$ 植物である Maize では P 700 再還元速度は速く，half-time（$t_{1/2}$）はそれぞれ 178 ms，196 ms である．これは暗黒下でサイクリック電子伝達経路を介して入ってくる還元力が P 700 を還元するためであると考えられる．Synechocystis では，NDH 欠損株において P 700 の再還元速度が著しく遅くなる報告されている[12)]．一方 $C_3$ 植物である tobacco では P 700 再還元速度の half-time は 1,157 ms と非常に遅い．この結果は $C_3$ 植物では光化学系 I サイクリック活性が藍藻や $C_4$ 植物と比べて低いことと一致する[11)]．しかし *⊿ndhB* 葉緑体形質転換タバコや Antimycin A で処理したタバコの葉における P 700 再還元速度の half-time は，未処理の野生株の値とほとんど変わらない[11)]．従って，$C_3$ 植物においてこの方法で光化学系 I サイクリック活性を評価することは難しいと考えられる．

## 参考文献


1）J. D. Mills, D. Crowther, R. E. Slovacek, G. Hind & R. McCarty Biochim. Biophys. Acta **767** (1979) P.127

2）T. Endo, T. Shikanai, F. Sato & K. Asada Plant Cell Physiol. **39** (1998) P.1226

3）Y. Munekage, M. Hashimoto, C. Miyake, K. Tomizawa, T. Endo, M. Tasaka & T. Shikanai Nature **429** (2004) P.579

4）Y. Munekage, M. Hojo, J. Meurer, T. Endo, M. Tasaka & T. Shikanai Cell **110** (2002) P.361

5）M. Hashimoto, T. Endo, G. Peltier, M. Tasaka & T. Shikanai Plant J. **36** (2003) P.541

6）T. Shikanai, T. Endo, T. Hashimoto, Y. Yamada, K. Asada and A. Yokota Proc. Natl. Acad. Sci. USA **95** (1998) P.9705

7）K. Asada, U. Heber & U. Schreiber Plant Cell Physiol. **33** (1992) P.927

8）Y. Okegawa, T. A. Long, M. Iwano, S. Takayama, Y. Kobayashi, S. F. Covert & T. Shikanai Plant Cell Physiol. **48** (2007) P.1462

9）P. Joliot & A. Joliot Biochim. Biophys. Acta **1757** (2006) P.362

10）B. Nandha, G. Finazzi, P. Joliot, S. Hald & G. N. Johnson Biochim. Biophys. Acta **1767** (2007) P. 1252

11）T. Joët, L. Cournac, G. Peltier and M. Havaux Plant Physiol. **128** (2002) P.760

12）H. Mi, T. Endo, U. Schreiber, T. Ogawa and K. Asada Plant Cell Physiol. **33** (1992) P.1233

# 3．パルス変調蛍光
## d．高等植物葉緑体チラコイド膜光化学系IIおよびI電子伝達活性の生葉での同時測定

三宅　親弘[1)]

測定光をパルス変調したロックイン増幅検出系を，生葉での蛍光測定法および分光測定法に用いて以来，クロロフィル蛍光測定におけるPSIIの量子収率解析あるいは光化学系I反応中心P700の量子収率解析が盛んに行われてきた（Genty et al. 1989, Klughammer and Schreiber 1994）．これは，パルス変調による測定光シグナルの交流化によりノイズ低減そして分光法における測定光の透過あるいは反射シグナルの増幅，また測定光に対する蛍光シグナルの増幅効率の飛躍的増大の恩恵による．パルス変調系のシステムおよび原理の詳細，さらにPSIIおよびPSIそれぞれの量子収率を見積もるモデルは，4章3.aを参考にしていただきたい．ここでは，生葉を用いて，光合成電子伝達系の光化学系IIおよび光化学系Iの電子伝達活性を同時に測定解析する方法を紹介する．

## Measurements of Photosynthetic Electron Flow In Vivo

Chikahiro Miyake

Methods for the simultaneous determination of photosynthetic electron flows in both PSI and PSII with the technique of pulse amplitude modulation (PAM) were introduced.

### 3.d.1　原理

#### 3.d.1.1　葉緑体チラコイド膜光化学系II電子伝達活性

##### 3.d.1.1.1　活性評価の考え方

生葉における非循環的光合成電子伝達（リニアーエレクトロンフロー：linear electron flow（LEF））活性は，光化学系IIの水の光酸化の結果生じる電子が，プラストキノン，シトクロム *b*/*f*-複合体，プラストシアニンを経由し，光励起された光化学系Iを介して，Fd-FNRによりNADP$^+$の還元に利用される速度として評価される．つまりLEFで流れる電子の由来は，PSIIで生成するものであり，その電子生成速度はPSII反応中心P680の光によるターンオーバーによる．したがって，4章3.aで記載されているパルス変調システムを用いたクロロフィル蛍光強度の測定で得られるPSIIの量子収率（Φ(PSII)）がLEFの電子伝達活性を反映し，LEFは，PSIIの電子伝達活性として示される（式1）．

##### 3.d.1.1.2　Φ(PSII）の意味するもの

PSIIの量子収率Φ(PSII)は，その定義より，PSIIに吸収された光の量子密度に対するPSII反応中心クロロフィルP680のターンオーバーの割合を示す．したがって，PSIIが吸収する光の量（$\alpha$ x PFD）とLEFの活性(PSIIの電子伝達活性(Je(PSII))との間には以下の関係式が成立する．

$$\begin{aligned} LEF &= Je(PSII) \\ &= \alpha \times \Phi(PSII) \times PFD \end{aligned} \qquad (1)$$

LEF：非循環的光合成電子伝達（リニアーエレクトロンフロー：linear electron flow(LEF)）活性であり，PSIIの電子伝達活性（Je(PSII)）として示される．単位は，$\mu$mol e$^-$m$^{-2}$s$^{-1}$である．

$\alpha$：チラコイド膜におけるPSIIへの光の分配率である．したがって，PSIへの光の分配率$\beta$の値と合わせると，$1=\alpha+\beta$の関係をもつ．

Φ(PSII)：PSIIの量子収率

PFD(photon flux density)：生葉へ照射される光の光量子密度であり，単位は$\mu$mol photons m$^{-2}$s$^{-1}$である．

実際の，多くの生葉が示すJe（PSII）と光強度の関係は図1の様式が一般的である（ここでは，モデル的に示す）．

この図から明らかなように，弱光の領域では，光強度の増大とともに，LEFは増加する．これは，LEF速度の律速が光供給にあることを反映しており，Φ(PSII)が高い値で一定に維持されていることを示している（図2）．

1）神戸大学大学院　農学研究科　生命機能科学専攻　植物栄養学研究室

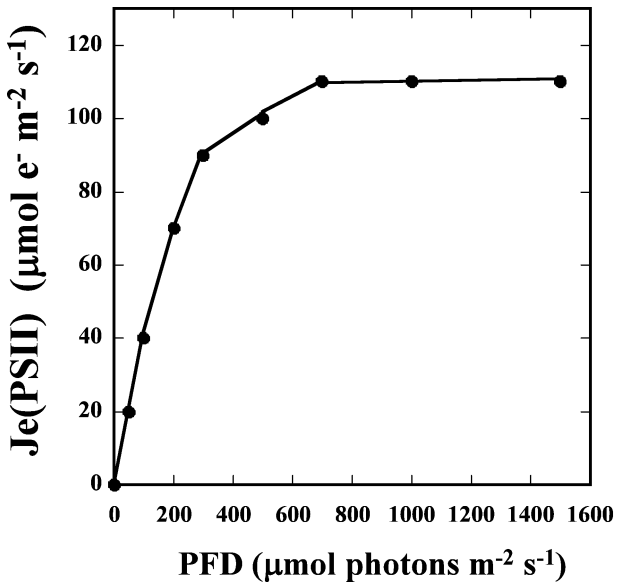



図1：PSII 電子伝達活性（Je(PSII)）の光強度依存性

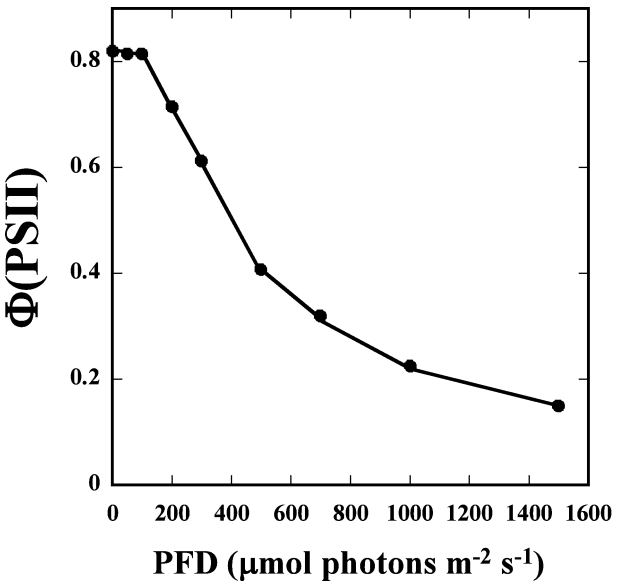



図2：PSII 量子収率（Φ（PSII））の光強度依存性

一方，光強度の増大とともに，LEF はその増加が頭打ちになり，最終的には飽和してしまう．これは，LEF 速度の律速が，暗反応での $CO_2$ 固定速度によることを反映している．このような状況下では，Φ(PSII) は光強度の増大とともに，減少しており，このことが LEF の低下を説明する．

### 3.d.1.2　葉緑体チラコイド膜光化学系 I 電子伝達活性

#### 3.d.1.2.1　活性評価の考え方

生葉での PSI の電子伝達活性評価には，現在，主に，2 つの方法が活用されている．以下にその考え方を紹介する．

#### 3.d.1.2.2　PSI の量子収率測定解析

基本的に，PSII の量子収率と同じ考え方である（Klughammer and Schreiber 1994）．つまり，その定義より，PSI に吸収された光の量子密度に対する PSI 反応中心クロロフィル P 700 のターンオーバーの割合を示す．したがって，PSI が吸収する光の量と PSI の電子伝達活性（Je（PSI））との間には以下の関係式が成立する．

$$Je(PSI) = \beta \times \Phi(PSI) \times PFD \qquad (2)$$

Je(PSI)：PSI の電子伝達活性である．

$\beta$：チラコイド膜における PSI への光の分配率である．したがって，PSII への光の分配率 a の値と合わせると，$1 = \alpha + \beta$ の関係をもつ．

Φ(PSI)：PSI の量子収率

PFD(photon flux density)：生葉へ照射される光の光量子密度であり，単位は $\mu$mol photons $m^{-2}s^{-1}$ である．

Φ(PSI) の評価の原理は，4 章 3.a を参照されたい．なお，光の分配率を考慮しない Φ(PSI) x PFD の値は，PSI の相対電子伝達活性を示す．これは，また，PSII の相対電子伝達活性にも適用され，それは Φ(PSII) x PFD として示される．

#### 3.d.1.2.3　光励起 P 700$^+$ の減衰速度測定解析

この解析では，以下のモデルが前提になっている（Clarke and Johnson 2001）．

$$P\,700 \underset{k2}{\overset{k1}{\rightleftharpoons}} P\,700^+ \qquad (3)$$

P 700 が光励起される P 700$^+$ 生成過程：速度定数を k1 とする

P 700$^+$ がプラスシアニンにより還元される P 700 再生過程（ここでは，還元されたプラストキノンからの電子がシトクロム *b*/*f*-複合体を経てプラストシアンに受け取られている）：速度定数を k2 とする

定常状態では，反応式（3）は，P 700 が励起され，そして P 700$^+$ が還元される反応が平衡状態にある．このとき，P 700$^+$ の還元の速度 v(P 700$^+$) は，

$$v(P\,700^+) = k \times (P\,700^+)$$

として示される．k は，P 700$^+$ の見かけの速度定数であり，k2 に等しい．このモデルに従えば，k の大きさと P 700$^+$ の大きさに依存して，P 700$^+$ の還元速度が見積もられ，その値は，シトクロム *b*/*f*-複合体，そしてプラストシアニンを介した還元型プラストキノンからの電子流入速度を反映することになる．

## 3.d.2　方法

### 3.d.2.1　機器の設置

PSII および PSI の電子伝達活性を，１つの生葉において同時に測定する場合，Walz 社の PAM を 2 台用いる．

下記に，測定システムの構図を示す．

PSII 量子収率評価のためのクロロフィル蛍光のシグナルは，チャート式レコーダーを用いて記録する

PSI 量子収率評価のための $P700^{+}$ のシグナルは，パルス照射に伴う短時間の時間遷移（ミリ秒〜500 ミリ秒）でモニターが可能なオシロスコープを用いた記録計を活用する．

解析する生葉は，Li-Cor 社 LI-6400 に付属するアラビチャンバーにセットする．このチャンバーでは，葉温はモニターされないので，別途，熱伝対を用意し，生葉の温度をモニターする必要がある．

PSII および PSI の量子収率評価での電子伝達活性測定のためには，Walz 社 PAM のグラス・ファイバーを LI-6400（LiCor 社）付属のアラビチャンバーの上部に固定しなければならない．そのためには，チャンバー上部と一体化する筒状の固定ユニットを自作する必要がある（図 4）．ただし，これは測定時，Walz 社 PAM のグラス・ファイバーがセットされたアラビチャンバーからずれることなく一定に固定できる状況であれば，必ずしも必要ではない．

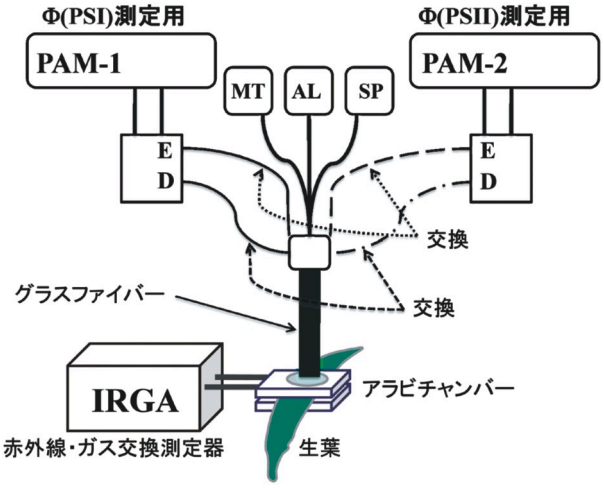



図 3：光化学系 I および光化学系 II 電子伝達活性同時測定システム．PAM-1，Φ(PSI) 測定用 PAM（ドイツ Walz 社）；PAM-2，Φ(PSII) 測定用 PAM（ドイツ Walz 社）；E および D，（Φ(PSI) 測定の場合）PAM 付属の測定光のエミッターおよび反射光の検出部，（Φ(PSII) 測定の場合）PAM 付属の測定光のエミッターおよびクロロフィル蛍光の検出部；MT，PAM 付属の Multiple　Turnover　Flash ユニット；AL，PAM 付属の作用光（Actinic light）照射ユニット；SP，PAM 付属の飽和パルス光照射ユニット（クロロフィル蛍光解析による Φ(PSII) の見積もりに用いる）；IRGA，赤外線ガス交換測定器（この図では，測定器に付属したアラビチャンバー（商品名）が使用可能な米国 Li-Cor 社製 LI-6400 を想定している）．

### 3.d.2.2　PSIIおよびPSIの電子伝達活性の同時測定

本方法では，PSII のクロロフィル蛍光強度を常時モニターしつつ，PAM クロロフィル蛍光測定用のパルス測定光照射のためのエミッター（E）およびパルス変調蛍光

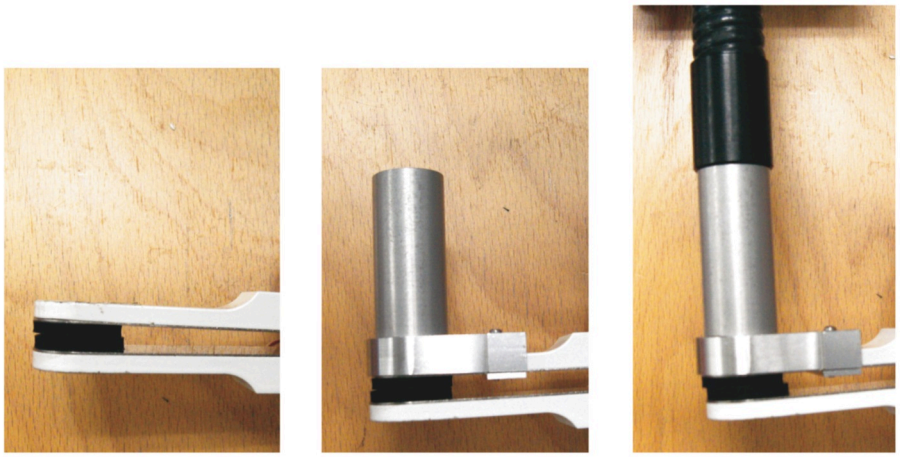



図 4：アラビチャンバー（商品名）（米国 Li-Cor 社製 LI-6400 付属）へ，PAM 用グラスファイバー（ドイツ Walz 社）を接続する筒の外観図

検出のための検出部（D）それぞれに連結されているPAMのグラス・ファイバーを，PSI量子収率評価を目的にP 700$^+$測定のための測定光エミッター（E）および検出部（D）に連結しなおす必要がある．

PSII量子収率測定のためのクロロフィル蛍光測定およびPSI量子収率測定のための一般的方法および注意点は，他の章(4章3.a)もまた参照されたい．ここでは，とくにP 700$^+$のシグナル検出において，PAMの設定に言及する．

P 700$^+$シグナル測定での測定光による生葉からの反射光を感度よく測定するためには，測定光強度を可能な限り最大にする必要がある．そのためには，PAM-101ユニットにおいて，検出されるシグナルが過負荷（OVERLOAD）にならない程度に測定光強度（Measuring Light Intensity）を増大あるいは測定光の検出感度（GAIN）を増大させる．さらに，PSIの量子収率測定のために照射する飽和パルスの照射開始そして終了後のP 700$^+$の時間変化（ミリ秒〜500ミリ秒）をモニターするために，測定光の変調周波数を100 kHzに設定する．

生葉において，光合成を駆動させるための光（作用光；Actinic light（AL））の照射を行っている際あるいは暗黒下，最大のP 700$^+$の量を見積もるために照射する飽和パルス光として，Walz社PAMオプションMultiple Turnover Flashユニット（MT）が与える50 msのパルス光を利用することができる．これにより，PSIの量子収率（Φ(PSI)）を以下のモデルから見積もることが可能となる（詳細は，4章3.a参照）．

$$\Phi(\mathrm{PSI}) = \frac{\text{（光照射時あるいは暗黒下，飽和パルスで生成するP 700}^+\text{シグナル強度）}}{\text{（暗黒下，遠赤外光で生成するP 700}^+\text{シグナル強度）}} \quad (4)$$

実際の解析においては，作用光を照射後，LI-6400でモニターする$CO_2$固定速度が定常値に達するのを観測する．この間，クロロフィル蛍光解析によるPSIIの量子収率評価も同時に行っておく．

ある条件の下，たとえば一定の光強度の下，$CO_2$固定速度が定常値に達した後，PAMのグラス・ファイバーをP 700測定に切り替える．この折，検出されるP 700$^+$のシグナルは，オフセットし，ゼロ合わせをしておく．その後，50 msの飽和パルス光照射を行い，生成するP 700$^+$シグナルの強度を評価し，PSIの量子収率を見積もる．測定後，再度，PAMのグラス・ファイバーをクロロフィル蛍光測定に切り替える．このようにして得られたΦ(PSI)とΦ(PSII)の値を用いて，PSIおよびPSIIの電子伝達活性の光強度依存性を調べた結果を下記に示す（図5，6）（三宅：未発表）．

### 3.d.2.3　光励起P 700$^+$の減衰速度測定解析

本方法では，作用光の照射後のP 700$^+$の減衰を評価す

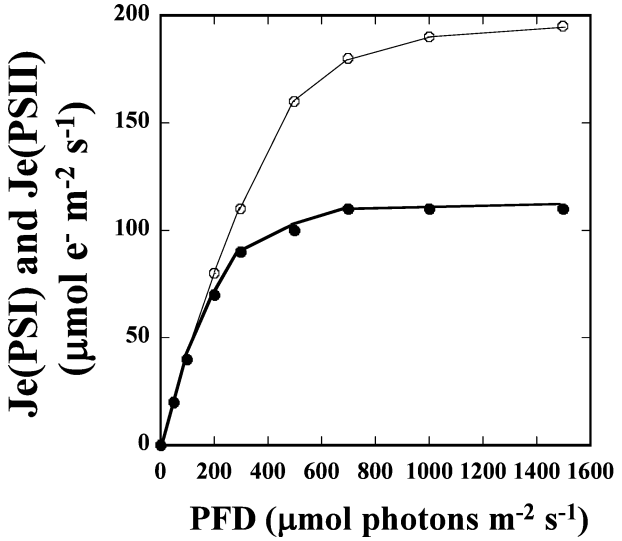



図5：PSIおよびPSII電子伝達活性（Je(PSI)およびJe(PSII)）の光強度依存性：○，Je(PSI)；●，Je(PSII)．光強度の増大とともに，Je(PSII)は増大するがやがて飽和する．一方，Je(PSII)は，Je(PSII)が光強度に対して飽和した後もその活性は増大し，強光下での活性は，Je(PSII)を上回っている．

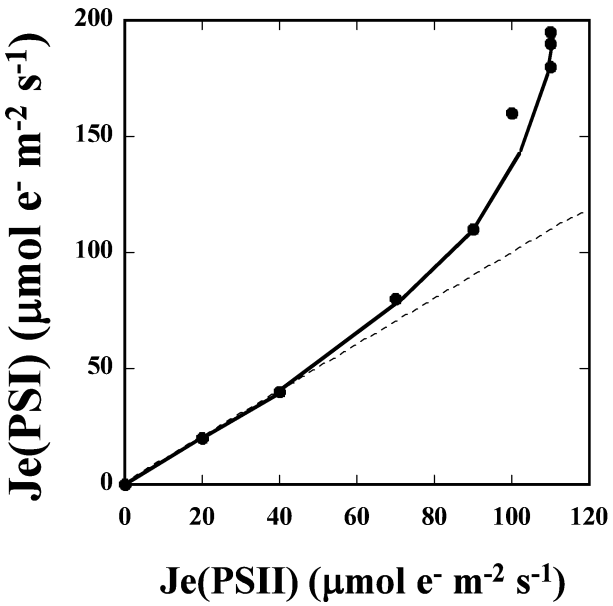



図6：PSI電子伝達活性のPSII電子伝達活性に対するプロット．図5で得られたJe(PSI)の値をJe(PSII)に対してプロットした．Je(PSI)の値がJe(PSII)と同じ値をとる場合の点線が示されている．Je(PSII)の光飽和に伴い，Je(PSI)はJe(PSII)の値とのずれを示し，そのずれは光強度の増大とともに大きくなる．これは，PSI循環的電子伝達活性の発現と，光強度による活性増大を反映している．

る必要があるために，定常状態に達した後，光が消える時間が発生する．筆者の経験では，約1～3秒の暗黒時間は，定常状態にある光合成の$CO_2$固定速度に影響を与えない．

この測定では，光照射後の$P700^+$の減衰を記録できるように，減衰時間である数百マイクロ秒～ミリ秒に対応できるオシロスコープが必要とされる．この測定でもやはり，$P700^+$シグナル検出条件は，上記と同様に設定する．

モニターすべき内容は，光照射中の$P700^+$のレベルおよび光照射後の$P700^+$の減衰曲線である．この測定では，$P700^+$の減衰曲線から$P700^+$が低下する速度定数（k）の値を見積もる必要がある．そのためには，オシロスコープへ取り込んだデータを用いて，減衰曲線を1次減衰カーブ（次式）として近似させるカーブフィッティング処理を行い，kの値を見積もる．フィッティングされたデータの処理は，市販の数式処理ソフトウェアの活用が可能である．

$$P700^+ = A \times \exp(-k) \qquad (5)$$

A：光照射停止前の$P700^+$のレベル

得られたkおよびAの値を用いて，$P700^+$へ電子が流入する速度の初速を次式から評価する．

$$v(P700^+) = k \times (P700^+) = k \times A \qquad (6)$$

また，この方法によるPSI電子伝達活性の評価も，PSIIクロロフィル蛍光解析と同時に行う場合は，PAMのグラス・ファイーバーの交換を行う必要がある．

## 3.d.3　問題点

### 3.d.3.1　光の分配の見積もり

生葉において，PSIIおよびPSIの電子伝達活性を見積もる場合，それぞれの活性の値を示す式に見られるように，光の分配率（$\alpha$および$\beta$）が含まれる．$\alpha$および$\beta$は，

$$1 = \alpha + \beta \qquad (7)$$

の関係をもつ．そこで，$\alpha$あるいは$\beta$のいずれかの値が明らかになれば，PSIIおよびPSIの電子伝達活性を見積もることができる．幸いなことに，クロロフィル蛍光解析によるPSII量子収率測定とガス交換解析による$CO_2$固定速度測定を同時に行うことにより，PSIIへの見かけの光分配率（$\alpha$）を見積もることができる（4章3.b）．その値から，$\beta$を見積もり，PSIIおよびPSIの電子伝達活性を評価する．

### 3.d.3.2　PSI量子収率測定における暗黒下での$P700^+$の見積もり

一般に，長時間暗黒下に置かれた植物の光合成は不活化しているために，光照射直後は光合成電子伝達系が機能しない，またカルビンサイクル酵素が機能しない状況になっている．そのため，暗黒下での飽和パルス光照射による$P700^+$の見積もり値が，遠赤外光により見積もられる値を下回る場合が多く見受けられる．この問題を克服するためには，中程度の光強度（200～300 $\mu$mol photons $m^{-2}s^{-1}$）で光合成を行わせ，定常状態に達した後に遷移的に暗黒下，その後の作用光の光強度を増大させる測定手順をとることにより，弱光下でのPSI量子収率を評価できる．

### 3.d.3.3　光励起$P700^+$の減衰速度測定解析の問題点

この方法の問題点は大きく2つに分けられる．第1に，$P700^+$が生成し，その量は検出できるレベルでなければならない．このような状況は，光合成を駆動するための光の強度がある程度大きくなければならず，弱光下でのPSI電子伝達活性の評価を困難なものにしている．第2に，式6から明らかなように，PSI電子伝達活性の絶対値を見積もることはできない．したがって，任意の生葉での相対値評価のみが可能であるということである．この点，さまざまな処理を施した植物間，あるいは他の品種間，また野生型と組換え体との間での活性比較が困難となっている．

## 参考文献


1）Genty, B., Briantais, J. M. and Baker, N. R. Biochim. Biophys. Acta **990** (1989) P.87.

2）Klughammer, C. and Schreiber, U. Planta **192** (1994) P. 261.

3）Clarke, J. E. and Johnson, G. N. Planta **212** (2001) P. 808.

# 3．パルス変調蛍光
## e．二次元解析

髙見　常明[1)]，遠藤　　剛[2)]

現在，海外の数社からクロロフィル蛍光測定装置とCCDカメラを組み合わせた2次元測定を目的とした装置が市販されている．ここでは，二次元測定の実際とそれを利用した光合成突然変異株の選抜について述べる．

## 2-D analysis of chlorophyll fluorescence

Tsuneaki Takami, Tsuyoshi Endo

Practical application of commercially available equipments for 2-D analysis of chlorophyll fluorescence is shown. Screening of photosynthetic mutants using 2-D fluorescence analysis is also presented.

### 3.e.1　二次元測定装置

これまでに市販されている二次元クロロフィル蛍光装置にはImaging PAM（Walz社），FluorCam（PSI社），CF imager（Technologica社）などがある．また自作することも可能である．これらの装置はそれぞれパルス変調法（Imaging PAMとCF imager）ポンプ&プローブ法（FluorCam）を用いている．また解析プログラムの特徴として飽和閃光照射時の画像（パラメータ）取得を行う装置（Imaging PAM），任意ヵ所の画像取得を行える装置（FluorCam, CF imager）と大別できる．

二次元クロロフィル蛍光装置は，その名の通りクロロフィル蛍光を画像として取得し解析できる装置である．市販されている装置はあらかじめ測定に必要なプログラムテンプレートが付属されている．ある程度測定者の任意で測定系を構築でき，誰でも簡単に測定できる．注意する点は装置によって測定に用いる光強度が%表示であったり，デフォルト値で設定されているため実際の光強度とは異なった値であったりするため，測定前に光強度を確認・調整することである．各装置の特徴を以下に示す．

・Imaging PAM：
クエンチング，光合成電子伝達量（光―光合成曲線）解析ができる
解析プログラム数は少ない
飽和閃光照射時のパラメータを記録
ROI（region of interest，装置により表現が異なるので注意）を設定している部分のクロロフィル蛍光キネティクスを表示
装置ラインナップが豊富

・FluorCam：
蛍光誘導期，クエンチング解析ができる
解析プログラムを実験者の任意で作成可能
クロロフィル蛍光のサンプリングレート（画像取得）を設定できる
ピクセルごとのクロロフィル蛍光キネティクス表示が可能
装置ラインナップが豊富でカスタマイズ可能
アクセサリーが豊富

・CF imager：
蛍光誘導期，クエンチング解析ができる
解析プログラムを実験者の任意で作成可能
解析項目が充実
光源に16枚のLEDパネルを使用（光源の自由度が高い）
他の2機種ではできない長時間の測定ができる

これらの装置は測定が自動であり難しい操作を必要としないため，強光ストレスなどのストレス処理の評価などに有用な装置である．またWalz社，Hansatech社，PSI社などから発売されているPAM，FMS，Fluormetersなどのクロロフィル蛍光測定装置とほぼ同等の

1）九州大学生物資源環境科学府
2）京都大学生命科学研究科

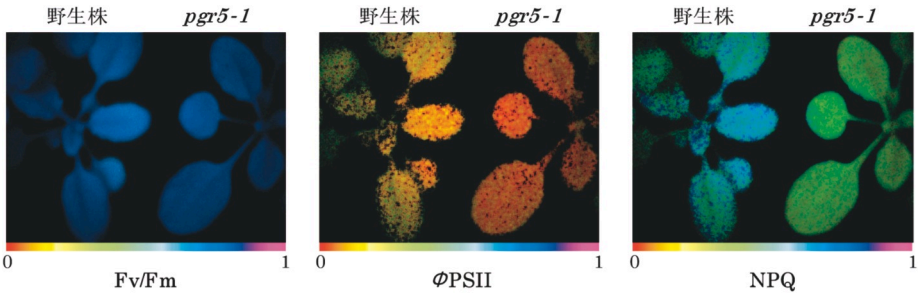



**図1**：Imaging PAM による二次元クロロフィル蛍光パラメーター画像
それぞれ光化学系II最大量子収率（Fv/Fm），光強度 600 $\mu$mol $m^{-2}s^{-1}$ における光化学系II量子収率（$\phi$PSII），熱放散の指標である NPQ の二次元画像である．*pgr5-1* はサイクリック電子伝達を欠き，チラコイド膜を介した pH 勾配が形成されにくい突然変異株である．そのため強光条件下では $CO_2$ 固定に必要な ATP が不足し，その結果 $\phi$PSII が低下すると考えられている．同様に熱放散の誘導には pH 勾配の形成（チラコイドルーメンの酸性化）が必要であるため，*pgr5-1* では NPQ の値が強光条件下において野生株よりも低くなる．

解析が行え，光化学系II最大量子収率（Fv/Fm），光化学系II量子収率（$\phi$PSII），Non-Photochemical Quenching（NPQ）などのクロロフィル蛍光から算出されるパラメータを二次元画像として取得できる（図1）．また ROI を設定することで画像からパラメータを算出することも可能である．

最近では二次元クロロフィル蛍光装置を使った研究が多く報告されており，強光ストレス応答や凍結・低温ストレス応答の評価[1,2]，病原菌感染の経時応答[3]，*dg1* のような葉緑体形成に異常を表す変異株の評価[4] などに使われている．

## 3.e.2　装置の自作について

パルス変調法を必要としない二次元クロロフィル蛍光測定装置は，光源とフィルターと CCD カメラを組み合わせることで比較的容易に自作可能である．市販されている二次元クロロフィル蛍光装置では画像解析結果を自動で算出するのに対し，自作した二次元クロロフィル蛍光装置では画像取得・演算用のソフトウエアを自作するか，画像解析ソフトを使用して画像演算を行う必要がある．手間のかかる自作装置の利点はあるか？という疑問が生じるが，市販の装置と比べて検出器となるカメラを高性能なものを使うことが可能であるため，非常にきれいな画像の取得が行え，後述する光合成突然変異株の単離の強力なツールとなる[5]．

光化学系 I の循環的電子伝達系のひとつである NDH 経路の活性を欠く突然変異株で具体例を示すと，自作した装置では，図2に示すように任意ヵ所での画像取得が可能で image2 から image1 を減算することにより野生株は像が浮かび上がり，NDH 活性を欠く *crr2-2* では像が消失するという画像処理が行える．また画像演算を行う際，*crr2-2* の像を浮かび上がらせることも可能であり，NDH 活性欠損変異株のスクリーニングやポジショナルクローニングを行う際に効果的である．このような機能は市販の装置にはプログラムテンプレートの都合上，基本的には装備されていない．任意で画像取得ができる FluorCam では減算することは可能であるが，カメラ性能が劣るため鮮明な像を得ることは難しい．

## 3.e.3　二次元クロロフィル蛍光装置での測定手順

1）暗馴化した植物にピントを合わせる[注1]．市販の装置では構造上の理由からカメラの焦点距離と光源からの照射距離が制限されてしまう．鮮明な画像を取得するためには一番初めにピントを合わせることが重要である．

2）測定光を設定する．測定方式にポンプ&プローブ法を用いている FluorCam ではカメラシャッタースピードと感度を測定光と合わせて設定を行わないとクロロフィル蛍光が飽和してしまい正しい測定が行えない．

3）作用光・飽和閃光の設定する．多くの測定の場合，飽和閃光は最大にしておいて問題ない．光源の角度や被写体との距離を自由に設定できるタイプの装置では，視野の中心と周辺で受光量が大きく異なることがあるので，光量を測りながら光源の角度等を微調節する必要がある．距離が離れすぎると中央では飽和している閃光が，周辺では飽和閃光になっていないという

[注1] 測定上の注意として市販の装置，自作の装置ともに画像演算を行い，クロロフィル蛍光パラメータを算出するため，測定中に風などで植物が動かないようにする．

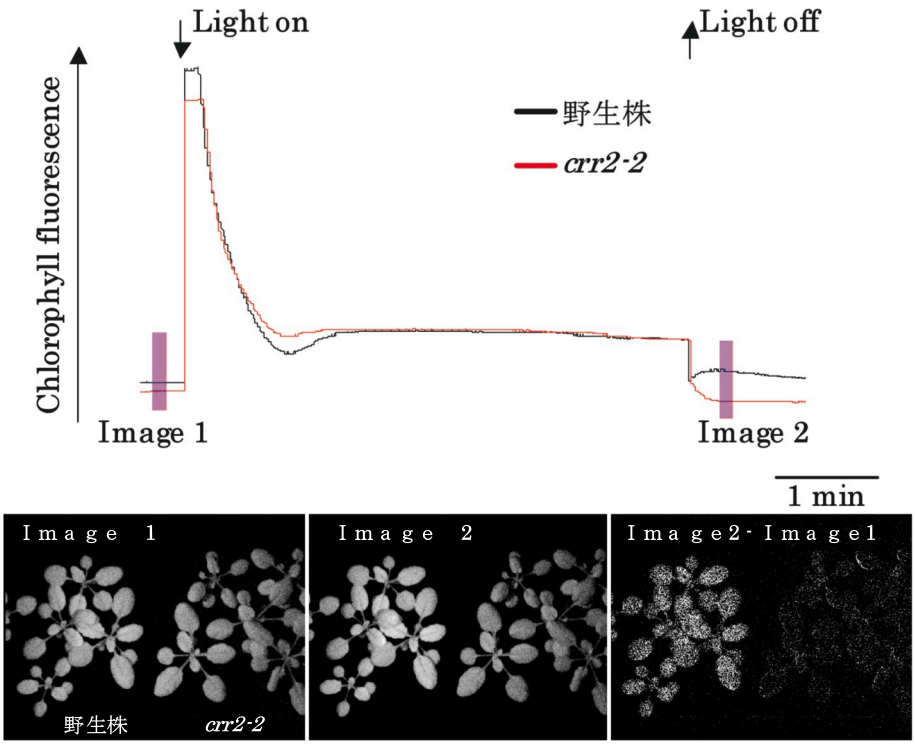



**図2**：自作二次元クロロフィル蛍光装置による NDH 活性の評価
NDH 活性を欠く変異株 *crr2-2* では作用光消灯後のクロロフィル蛍光の一過的上昇が起こらないため image2 から image1 を差し引くと野生株のクロロフィル蛍光のみが現れる．

状況もあり得るわけで，当然計算される蛍光パラメータに信頼はおけなくなる．

4）解析開始．

5）解析終了．市販の装置であればクロロフィル蛍光から算出されるパラメータが画像として自動的に算出される．

## 3.e.4　二次元クエンチング解析による光合成突然変異体の選抜

クロロフィル蛍光を指標とした光合成突然変異株の選抜は古くから行われており，一般に hcf（high chlorophyll fluorescence）と称され，その幾つかは原因遺伝子が同定され生化学的な解析も行われている．二次元クロロフィル蛍光装置では様々な蛍光パラメータに着目した選抜が容易に行える．多くのパラメータのうち，最も端的に光合成活性に直結し，市販の二次元クロロフィル蛍光装置にデフォルトで計算式が組み込まれているものは，Fv/Fm，NPQ，qP などであり，光合成機能の欠損はこれらのパラメータを正しく測定することで，かなり詳細な情報を得ることができる．ここではこれらの蛍光クエンチング解析法のパラメータに異常を示す突然変異株の選抜についての紹介をする．なお当然のことながら光化学系や電子伝達の状態は光照射後数秒間の蛍光の初期誘導波形にも影響を与えるため，これに着目した選抜法も開発されており[6]，クエンチング解析に比べ測定が短時間で済む等のメリットがあり有力な選抜法として期待される．

### 3.e.4.1　材料と選抜法

ここでは植物分子遺伝学のモデルとなっているシロイヌナズナの幼植物を用いた実験を想定して論を進める．選抜の母集団には，T-DNA をランダムに挿入した形質転換体のライブラリまたは，エチルメタンスルフォン酸（EMS）等の突然変異誘発剤により変異を導入した植物のライブラリを用いる．もちろん劣勢ホモの形質が現れる世代の種子を用いる．シロイヌナズナの場合，ホルモンを含まない組織培養用寒天培地[注2]を張ったシャーレに滅菌種子を 50 ないし 100 個蒔き，発芽後 2 週間目程度の幼植物を対象として二次元クロロフィル蛍光装置にて

[注2] MS[7] や Gamborg の B5[8] 等の一般的な培地レシピーの塩濃度を 2 倍希釈または希釈なしで使用する．培地にショ糖を 1-3 %添加すると，光合成のみでは生育不可能な重篤な変異をもつ株も選抜できるが，これらは種子の採取が困難であり，その後の遺伝学的解析には不向き．

選抜を行う．

### 3.e.4.2　クロロフィル蛍光に異常のある変異株の分類

Meurer ら[9] はクロロフィル蛍光のクエンチング解析により，表現型を示す変異株を PSI の異常，PSII の異常，および光合成電子伝達系の異常に分類している．Shikanai ら[5] は，蛍光パラメータに基づいた実際的な分類として，(1)high Fo，(2)NPQ 形成異常，および(3)PQ 異常に分けており，ここではその分類に従う．一般に hcf の表現型を示す変異株は，実際の蛍光測定では，測定光照射下での蛍光（Fo）が高いものと，作用光照射下で蛍光レベルが時間とともにクエンチングされないものに大別される．前者は本来 Fv/Fm 値が低い変異株が，低い Fv/Fm による PSII 機能の低下を補う適応として，葉面積当たりの PSII の数を増やし Fo レベルが上昇したものと推定できる（high Fo タイプ）．すなわち high Fo とは low　Fv/Fm の裏返しの表現である．Fv/Fm 値は P 680 の近傍または酸化側の異常により低下する．また，光阻害の誘発および回復過程の異常も低下の原因となる．さらに，光合成電子伝達系や炭酸固定等に異常がある場合に，酸化的ストレス条件下では光阻害が起こるため，Fv/Fm 値が低下する．

作用光下で蛍光クエンチングがうまくできない突然変異株は，飽和閃光を照射することにより NPQ タイプと PQ タイプに選別することができる．NPQ タイプ（NPQ が低下する突然変異株）はキサントフィルサイクルに依存した PSII での過剰エネルギーの熱放散機構の異常や光化学系 I の循環的電子伝達の異常等に起因する．一方，PQ タイプ（PQ が低下する突然変異株）は $Q_A$ の還元側の電子伝達または光化学系 I の異常等により引き起こされる．

### 3.e.4.3　変異株の解析例

以上のようなスクリーニングで得られた変異株には，光化学系や光合成電子伝達系の構成タンパク質遺伝子そのもの，またはそれらの発現制御にかかわる遺伝子に変異を持つと考えられる．以下に最近報告された各タイプの突然変異株の原因遺伝子がコードしているタンパク質について解説する．

**・High Fo タイプ：**

HCF60（RPS 17）[10]（トウモロコシ葉緑体リボゾームサブユニット）

PsbO2[11]（アブラナ科特有の 2 つ目の PsbO イソタンパク質）

RnaR1[12]（葉緑体リボゾームの発現制御に機能する RNase）

HCF173（short-chain　dehydrogenase/reductase）[13]（psbA の転写後制御に関与するタンパク質）

**・PQ タイプ：**

PAA1[14]（葉緑体への銅イオン輸送にかかわる ATPase）

PGR3（PPR タンパク質）[15]（葉緑体遺伝子の転写後制御因子）

**・NPQ タイプ：**

PsbS[16]（キサントフィルサイクルにかかわる PSII アンテナ）

**・NPQ と PQ の複合タイプ：**

PGR5[17]（循環的電子伝達に必須なチラコイド膜タンパク質）

### 3.e.4.4　選抜の実際

1）15 分程度以上暗適応したシャーレ内の幼植物に測定光を照射し，Fo レベルのデータ（もしくは画像）を得る．High Fo タイプはこの時点で高い蛍光を示すため，選抜可能．

2）飽和閃光を照射し Fm 値を得る．この作業は後に Fv/Fm，NPQ，PQ 値を計算するために必要である．二次元画像で hcf 株を選抜する場合には必要ではない．

3）5 分間程度，作用光を照射した後，蛍光データを得る．この時点では NPQ タイプ，PQ タイプが高い蛍光を示す．弱めの作用光を照射すると PQ タイプが選抜しやすく，逆に強めの作用光を使うと NPQ タイプが選抜しやすい．両者を同時に選抜するためには，400 $\mu$mol $m^{-2}s^{-1}$ 程度の白色光が適当．NPQ タイプと PQ タイプを区別するには，作用光照射下飽和閃光を照射し，クエンチング全体に対する NPQ と PQ の比を測定すればよい．

4）以上，二次元測定により選抜された hcf 株は，表現型を確かめるため通常の PAM 蛍光測定装置で再度クエンチング解析を行う必要がある．二次元測定では high Fo タイプと PQ タイプの区別は難しいことが多い．これは測定光による反応中心の励起と蛍光放出が無視できないためで，両者を区別するためには，通常の PAM 測定の際に赤外光のバックグランドのもとで Fo を（正しく）測定する必要がある．また，PQ の低下は，NPQ の低下を招くことが多いため，PQ タイプと NPQ タイプの分別も典型的なものを除くと難しい場合が多い[5]．PQ タイプの変異の場合，P 700 の酸化還元測定を併用することにより，光合成電子伝達系の変異（または異常）の位置を推定することができる．

5）T-DNA の挿入位置の決定やポジショナルクローニ

ングで原因遺伝子を同定するとともに生化学的，遺伝学的解析を行う．遺伝子の同定が済めば，光合成電子伝達系や炭酸固定の構成成分の遺伝子が原因遺伝子の場合は，比較的簡単に決着がつく場合が多いが，葉緑体の遺伝子発現に関わる核支配の制御遺伝子であった場合には，遺伝子同定から先の研究が正念場になる．

## 参考文献


1）E. Miura, Y. Kato, R. Matsushima, V. Albrecht, S. Laalami, & W. Sakamoto, Plant Cell **19** (2007) P.1313.
2）B. Ehlert, & D. K. Hincha, Plant Methods **4** (2008) p.12.
3）S. Berger, Z. Benediktyová, K. Matouš, K. Bonfig, M. J. Mueller, L. Nedbal, & T. Roitsch, J. Exp. Bot. **58** (2007) P.797.
4）W. Chi, J. Ma, D. Zhang, J. Guo, F. Chen, C. Lu, & L. Zhang, Plant Physiol. **147** (2008) P.573.
5）T. Shikanai, Y. Munekage' K. Shimizu, T. Endo, & T. Hashimoto, Plant Cell Physiol. **40** (1999) P.1134.
6）M. Higuchi, & K. Sonoike, Fundamental Aspects to Global Perspectives, eds. A. van der Est, & D. Bruce, International Society of Photosnthesis, 2005, p.716.
7）T. Murashige, & F. Skoog, Physiol. Plant. **15** (1962) p. 473.
8）O. L. Gamborg, R. A. Miller, & K. Ojima, Exp. Cell Res. **50** (1968) p.151.
9）J. Meurer, K. Meierhoff, & P. Westhoff, Planta **198** (1996) p.385.
10）N. P. Schultes, R. J. H. Sawers, T. P. Brutnell, & R. W. Kruger, Plant J. **21** (2000) p.317.
11）R. Murakami, K. Ifuku, A. Takabayashi, T. Shikanai, T. Endo, & F. Sato, FEBS Lett. **523** (2002) p.138.
12）M. Kishine, A. Takabayashi, Y. Munekage, T. Shikanai, T. Endo, F. Sato, Plant Mol. Biol. **55** (2004) p.595.
13）K. Schult, K. Meierhoff, S. Paradies, T. Töller, P. Wolff, & P. Westhoff, Plant Cell **19** (2007) p.1329.
14）T. Shikanai, P. Müller-Moulé, Y. Munekage, K. K. Niyogi, & M. Pilon, Plant Cell **15** (2003) p.1333.
15）H. Yamazaki, M. Tasaka, & T. Shikanai, Plant J. **38** (2004) p.52.
16）X.-P. Li, O. Björkman, C. Shih, A. R. Grossman, M. Rosenquist, S. Jansson, & K. K. Niyogi, Nature **403** (2000) p.391.
17）Y. Munekage, M. Hojo, J. Meurer, T. Endo, M. Tasaka, & T. Shikanai, Cell **110** (2002) p.361.

# 4．酸化還元滴定

永島　賢治[1)]

電子伝達反応の向きと速度は，供与体と受容体それぞれの電子親和性の違い，すなわち酸化還元中点電位（$E_m$）の差に大きく依存する．この酸化還元中点電位を実験により求める方法として酸化還元滴定がある．本章では化学的方法による酸化還元滴定を中心に紹介する．

## Redox titration for electron transfer proteins

Kenji V. P. Nagashima

Redox midpoint potential is an important factor as a determinant of the direction and the rate of electron transfer.　Here, methods of titration to determine the redox midpoint potentials of electron transfer proteins are described.

### 4.1　はじめに

細胞内での電子伝達反応機構を調べるにあたって，電子供与体と受容体の電子の「渡し易さ」「受け取り易さ」を知ることは極めて重要なことである．この電子の授受の起こり易さを表す尺度として酸化還元電位がある．単位はボルト（V）で，定義としては標準水素電極における $H^+ + e^- \rightleftharpoons 1/2\ H_2$ の反応に伴う電極電位を0 Vとした時，対象となる電子の受け渡し反応（酸化還元反応）が示す電極電位のことで，これを標準酸化還元電位（$E_0$）と呼ぶ．酸化還元反応は周囲のpHの影響を強く受けるが，実際の生体反応を考える上ではpH 7の時の $E_0$ を考えることがほとんどであり，この時の標準酸化還元電位は $E_0$'または $E_{m,7}$ あるいはさらに省略して $E_m$ などと表現される．ちなみにpH 7の条件下では上述の水素の酸化還元反応は−0.42 Vとなる．

大まかな理解としてはある電子伝達成分がpH 7の緩衝液中で半量が酸化型，半量が還元型となっているときの電極電位（$E_h$）がその成分の酸化還元能を表していると考えて差し支えない．光合成研究の論文ではこの値を酸化還元中点電位（redox midpoint potential）と表記し，記号では $E_m$ を使うことが多い．一般には単に酸化還元電位とだけ表記することもある．

酸化還元滴定は $E_m$ を実験により求める手法であり，Duttonによって確立された化学的方法が広く用いられてきた[1)]．これは目的とするサンプルを含む緩衝液に酸化剤・還元剤を加えながら酸化還元状態を少しずつ変えていく方法で，電極を使って酸化還元電位を測定しながら分光測定を行い，サンプルの状態をモニターして $E_m$ を求める．本章では主にこの化学的方法による酸化還元滴定の実際について解説する．また，近年では電極で直接的に酸化還元状態を制御する方法（電気化学的方法）も用いられるようになってきているので，この事にも簡単に触れたい．

### 4.2　電極

酸化還元電位の測定に用いる電極はORP電極と銘打って市販されているもので，これは基準電極と作用電極をひとつにまとめた複合電極である．定義に従えば基準電極は水素電極とするのが自然であるが，ほとんどの製品では基準電極（比較電極）として銀―塩化銀（Ag/AgCl）電極を使用している．作用電極は白金である．

ORP電極はpHメーターに接続して使用する．たいていのpHメーターは電極電位をそのままmV表示するモードを備えているのでそれを利用する．注意すべきことはこのとき表示される電位は使っている基準電極に対する電位差であることで，この値を水素電極に対する電位差に換算してやる必要がある．基準電極が銀―塩化銀電極であって，かつ電極内部液として飽和KClを使用し室温（25℃）で測定する場合，水素電極に対して＋197 mVの差が生じる．水銀―塩化水銀を使ったカロメル電極（甘コウ電極）を基準電極とした場合，この差は＋241 mVとなる．

1）首都大学東京　大学院　理工学研究科　生命科学専攻　細胞エネルギー研究室

## 4.3　測定容器

図 1 に執筆者らが酸化還元滴定に使用している測定容器を示す．1 cm 角のガラスキュベット上部に湾曲した液溜め部を持ち，そこに内径 18 mm の開口部がキュベットの直上に，内径 15 mm の開口部がやや角度を付けかつキュベット直上に向けて二つ備えられている．15 mm の開口部の片方にはゴム栓を介して電極を取り付け，もう片方の口にはガス置換用のニードルをやはりゴム栓を介して装着している．この口は試薬を加えるときにも使用する．直上の開口部には攪拌用のモーターを取り付けてある．モーターは乾電池で作動する模型用のもので，直径 9 mm ほどの穴を空けたゴム栓を貼り付けて容器に装着している．モーター軸は切ったスパチュラ等（直径 2 mm）で延長し，ゴム栓の穴を通じて溶液部まで伸びている．その先端は平たく，さらにヒネリを加えることで攪拌効率を上げているが，作動時に電極を叩かないよう微調整が必要である．攪拌が強すぎると溶液が泡だって測定に悪影響を与えるので，モーターと電池の間に 10 オーム程度の可変抵抗を入れ，回転数を調節できるようにしておくと良い．電極は試料溶液に対しやや斜めに浸かることになるので液絡部が水面上に出ないよう深さや向きに注意しなければならない．酸化還元滴定では試料溶液の酸化還元平衡を安定に保つため容器内の酸素を除去する必要がある．これはニードルを通して窒素ガスやアルゴンガスを常に通気することで達成する．容器内が完全に密閉されている場合はガスを排出するためのニードルをもう一本追加する必要があるが，図 1 の装置の場合ではモーター部分の隙間から抜けるのでその必要は無い．ガス置換で気を付けたいのは，これらのガスがたいてい乾燥していることで，長時間の測定では試料溶液が濃縮される可能性が有る．そのため執筆者らは図にあるようなトラップを設け，窒素ガス等を蒸留水に通気してから測定容器へ導入している．このトラップは気泡の出方を見ることでガス流量モニターとしても利用できる．

ここで紹介した測定容器は酸化還元滴定法の草分けである Dutton らが使用したものに基づいた一例である．市販はされていないのでガラス器機業者に特注することになる．重要なのは (1) 試料溶液を嫌気条件下に保つことが出来る (2) 試料溶液を随意に攪拌できる (3) 使用する分光測定機器への装着に支障が無い，の 3 つの条件を満たすことである．

## 4.4　溶液組成

測定するサンプルは精製した電子伝達タンパクまたは

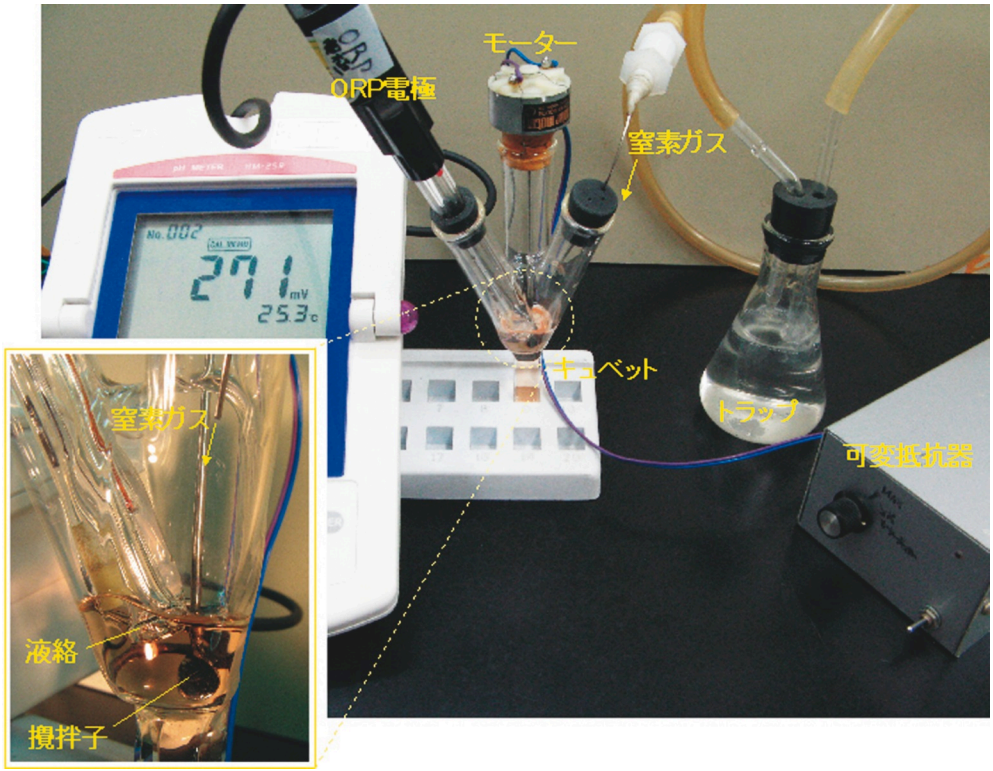



**図 1**：酸化還元滴定における測定用キュベットのセットアップ例

クロマトフォア等の膜標品となるが，これらの物質と電極の間に速やかでかつ安定した酸化還元平衡を成立させるために電子のやり取りを仲介する低分子化合物を加えておく必要がある．これら電子伝達を仲介する化合物をメディエーターと呼び，主なものを表1にまとめた．各メディエーターはそれ自体が酸化還元反応を行う物質であり特有の$E_m$を持っている．一つのメディエーターが平衡の安定化に寄与する$E_h$の範囲は限られており，おおよその目安としてその$E_m$の前後100 mV程度だと考えるとよい．従って酸化還元滴定を行う際には，自分の測ろうとする$E_h$レンジをいくつかのメディエーターを組み合わせてカバーするように考えなければならない．また，メディエーターの中には特有の波長に吸収帯を持ち，それが酸化還元状態に応じて変化する場合があるので，分光学的に滴定を行う場合はメディエーターの吸収変化が測りたい物質の吸収帯と重ならないように考慮する必要がある．執筆者が光合成細菌のクロマトフォアを使ってチトクロムの酸化還元滴定を行う場合を例に取ると，DAD 20 μM，Fe-EDTA 50 μM，PMS 5 μM，Pyocianin 5 μM，Hydroxy-1, 4-naphthoquinone 10 μM，Vitamin K3 20 μMの組み合わせで，おおよそ−200 mVから450 mVの範囲で測定を行っている．

酸化還元反応は先にも述べたとおりpHの影響を大きく受ける．後の章で説明するネルンストの式に従えば，溶液のpHが1ユニット上昇すると$E_m$は−60 mV変化することになる．従って測定溶液は十分な緩衝能を備えていなければならない．基本的にはpH 7で測定する事が多い．執筆者がよく利用するのは50 mMリン酸バッファーもしくは10 mM MOPSバッファーである．また，場合によっては違うpHで測定することが効果的なことがある．対象となる物質の$E_m$が低すぎたり高すぎたりして測定が困難なときはpH 1ユニットあたり60 mV変化することを逆に利用して，測定しやすいレンジに持ってくることが出来る．ただし覚えておきたいのは測定対象物質が溶液に露出しているかペプチド等に囲まれて溶液から隔離されているかでpHによる影響が変わってくることである．もちろん隔離されていればpH変化をほとんど受けないことになる．逆にこのことを上手く利用するとpH7での$E_m$が近接した2成分をバッファーのpHを変えることで見分けられるかもしれない．

溶液の酸化還元電位を変えるための酸化剤としてはフェリシアナイド(フェリシアン化カリウム)，還元剤としてはジチオナイト(ハイドロサルファイトナトリウム)がよく使われる．還元剤としては他にもジチオスレイトールや，100 mV程度以上の範囲を測定する場合にはアスコルビン酸なども使われる．滴定を行う際にはこれらの酸化還元剤を電極電位をモニターしながら適量ずつ加えていくことになるが，1，10，100 mM程度に濃度を分けて溶液を作っておくと使い勝手がよい．ジチオナイト溶液は空気との接触による自動酸化が速いので，測定の度に作り直す．ジチオナイトの場合は小試験管に粉末を少量(10 mg程度)入れ，洗瓶で蒸留水を静かに注いでやれば溶液上方に向かって薄くなる濃度勾配が出来るので，適当な層から溶液を吸い取りながら使うと便利である．

**表1**：酸化還元滴定でよく使われるメディエーター

| メディエーター名（カッコ内は通称または略称） | $E_m$ |
|---|---|
| Ferrocene carboxylic acid | +530 mV |
| Potassium ferricyanide | +430 mV |
| 1, 1'-Dimethylferrocene | +340 mV |
| N, N, N', N'-Tetramethylphenylene diamine（TMPD） | +260 mV |
| 2, 3, 5, 6-Tetramethylphenylene diamine（diaminodurol or DAD） | +260 mV |
| 2, 6-Dichlorophenol indophenol（DPIP） | +217 mV |
| 1, 2-Naphtoquinone | +145 mV |
| Trimethylhydroquinone | +100 mV |
| Fe-EDTA | +96 mV |
| N-Methylphenazonium methosulfate（PMS） | +80 mV |
| N-Ethylphenazonium ethosulfate（PES） | +55 mV |
| 2-Methyl-1, 4-naphtoquinone（Vitamin $K_3$ or Menadione） | 0 mV |
| N-Methyl-1-Hydroxyphenazonium methosulfate（Pyocanine） | −34 mV |
| 2-Hydroxy-1, 4-naphtoquinone | −145 mV |
| Anthraquinone-2-sulfonic acid | −225 mV |
| Benzyl viologen dichloride | −350 mV |
| Methyl viologen dichloride hydrate | −440 mV |

## 4.5 測定

1．測定容器にまずバッファーのみ（10 ml 位）を入れ，電極，攪拌子，ガス置換用ニードルをセットする．窒素ガスまたはアルゴンガスを通気しながら 20 分程度バッファーを攪拌し，嫌気状態を確立する．
2．サンプルとメディエーターを入れる．サンプルは濃度の高いものを少量入れるようにし，メディエーターも終濃度の 1000 倍程度に調整したものをストックとして使うようにする．なおメディエーターの中には水に溶けにくいものも多く，その場合ストック液はエタノールで作る．
3．酸化剤または還元剤を加え，容器内の酸化還元電位を高低いずれかに振っておく．
4．測定容器を分光光度計にセットし測定を開始する．滴定中も常にガスを通気しておくが，液面が揺れるほど過度に吹き付けないこと．攪拌も続けるが，スペクトル測定時には一時的に止める．
5．酸化剤または還元剤を極少量加えて酸化還元電位を変える．10 $\mu$l 容量のガラスシリンジで加えるのが望ましいが，キャピラリーチップを装着した小容量のピペットマンでも可．いずれにせよ測定容器に差し込む前にキムワイプ等で外側に付着した余分な溶液をふき取っておくこと．
6．目安として 10 mV ほど電位が変化し，容器内の酸化還元平衡が安定したところで分光測定する．この「安定した」という判断をいつ下すかが難しいところで，例えば 1 分間待っても電位の変動が ±1 mV 以内であるなど具体的な判断基準を作っておくと良い．
7．手順 5 と 6 を繰り返し，目的とする範囲まで測定を続ける．

酸化還元滴定は根気のいる作業である．酸化剤・還元剤を加える時，どれだけの量を加えれば望むだけの電位変化が起こるか予想するのは困難で，メーターの表示を見ながら慎重に作業しなければならない．ある $E_h$ レンジではシリンジの針先が溶液に触れただけで電位が大きく変わったり，またあるレンジでは大きく変化してもすぐに元の電位まで戻ってきたりする．こうした経験に基づいて，使用するメディエーターの組み合わせや濃度が決まってくる．単純にその種類を増やしたり濃度を高くすれば良いというものでもない．信頼性のあるデータを得るにはある程度「慣れ」が必要である．初めて酸化還元滴定に挑む場合，いきなり大事なサンプルを使うのではなく，まずは入手し易く性質のよく分かっている馬心臓チトクロム $c$ 等を使って練習すると良い．加えるメディエーターの種類と濃度は過去の文献を参照し，その条件下の各 Eh レンジで酸化還元平衡がどんな挙動を示すか体得しておくことが重要である．

酸化還元滴定は，ある程度慣れていても時間の掛かる作業である（フェリシアナイド／ジチオナイトを使った広い $E_h$ レンジの測定だと約半日から全日）．その間，サンプルが変性していないか，アグリゲーションを起こしていないか，時々測定容器を取り出してチェックする必要がある．また，面倒であっても酸化→還元（reductive titration）と還元→酸化（oxidative titration）の両方向とも滴定すべきで，論文の投稿の際などでもしばしばこの事が求められる．両者の一致性が低い場合，電極とサンプルの間で充分な酸化還元平衡が得られぬうちに測定していることが疑われる．

## 4.6 データ処理

測定作業の次に，得られたデータをグラフ上にプロットし $E_m$ を求める．横軸は水素電極を基準とした電極電位（$E_h$），縦軸に吸光度変化量をとるのが一般的である．図 2 に例として紅色光合成細菌 *Rhodovulum sulfidophilum* から単離・精製したチトクロム $c_{2m}$ を用いた滴定結果を示す．ここでは $\alpha$ 帯のすそ野（540 nm および 570 nm）を結んだ線をベースラインとし，551 nm のピークまでの吸光度差を縦軸にプロットしている．図 2 から読みとれるようにグラフはシグモイド曲線を描く．この曲線の上端（還元型）と下端（酸化型）の漸近線のちょうど中間に線を引き，曲線と交わる点が $E_m$ 値ということになるが，普通はコンピューターを使ってネルンストの式と呼ばれる理論式に当てはめ，線形回帰させたうえで求める．

$$\text{ネルンストの式：} E = E_0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{[ox]}{[red]} \qquad (1)$$

ここで $R$ は気体定数，$T$ は絶対温度，$n$ は反応にあずかる電子数（チトクロム $c_2$ の場合は 1），$F$ はファラデー定数である．$[ox]/[red]$ は酸化型と還元型のモル比を示しており，$E$ は電極電位，$E_0$ は標準酸化還元電位つまり今求めようとする $E_m$ にあたる．この式を図 2 のデータに合わせて横軸（$x$）を $E_h$（mV），縦軸（$y$）を差吸光度とし，さらに各定数（温度は 25°C とする）も代入して表現すると

$$y = \frac{a}{1+\exp(0.039(x-E_m))} + b \qquad (2)$$

と表すことが出来る．ここで $a$ はシグモイド曲線の上端と下端の差，つまり吸光度の変化量を，$b$ はシグモイド曲

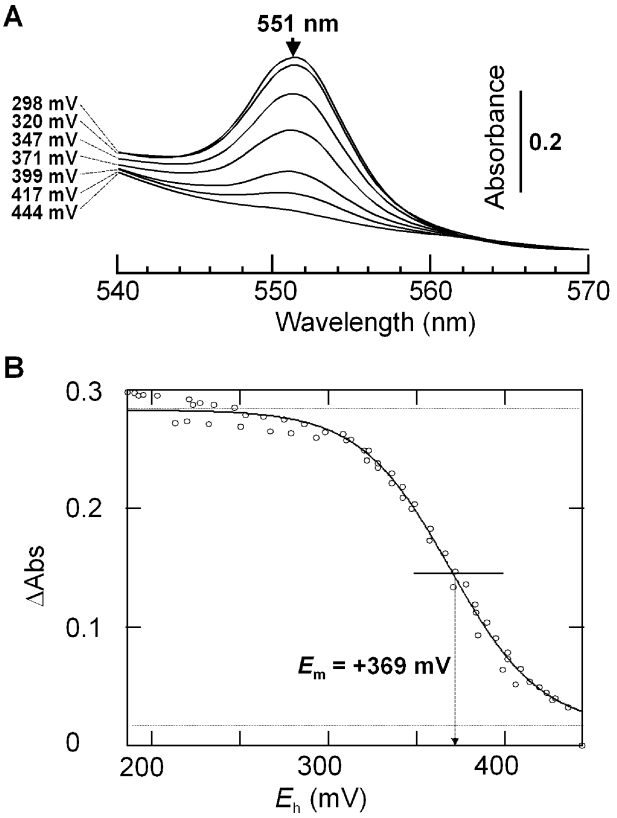



**図 2**：紅色光合成細菌 *Rhodovulum sulfidophilum* から精製した膜結合型モノヘムチトクロム *c* の酸化還元滴定
A．$E_h$ を変えていった時の $\alpha$ 吸収帯のスペクトル変化．B．$\alpha$ 吸収帯の吸収変化量を $E_h$ に対してプロットした結果．Kimura らの報告[5] から一部改変して転載．

線下端が示す吸光度（ベースライン）を示す．執筆者らは自作のプログラムによって線形回帰を行っているが，市販のデータ解析ソフトウェア（Origin Lab 社 Origin など）を利用しても同様の計算が出来るものと思われる．

図 2 で示したチトクロム $c_2$ は電子の授受を行う成分としてヘムを一つだけ含む単純な例であるが，電子伝達タンパクの多くは複数の電子伝達成分を持つ．$n$ 個の成分を含み，かつそれらの $E_m$ が同じである場合，(2)式の指数部分にある 0.039 に $n$ を乗じる．例えば電子伝達成分を一つ持つタンパクのホモダイマーであれば 0.039 x 2＝0.078 を適用することとなり，描く曲線の傾き部分は急になる．複数の電子伝達成分それぞれの $E_m$ に違いがある場合は (2) 式を加算することになる．この場合 $n$ 個の成分があるとすると

$$y=\frac{a(1)}{1+\exp(0.039(x-E_m(1)))}+\frac{a(2)}{1+\exp(0.039(x-E_m(2)))}+\cdots+\frac{a(n)}{1+\exp(0.039(x-E_m(n)))}+b \quad (3)$$

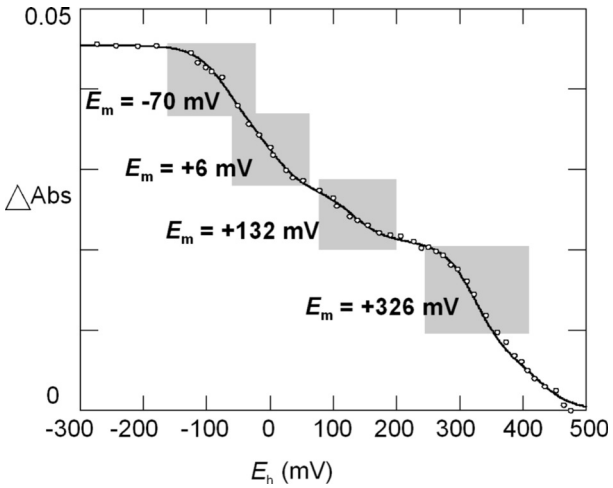



**図 3**：紅色光合成細菌 *Blastochloris viridis* の反応中心結合型 4 ヘムのチトクロム *c* の酸化還元滴定
測定サンプルはバクテリオクロロフィル濃度が 40 $\mu$m となるように調製した光合成膜標品（クロマトフォア）である．Nagashima らの報告[6] から一部改変して転載．

で表される．図 3 にこのような例として 4 つの *c* 型ヘムを含む紅色光合成細菌 *Blastochloris viridis* 反応中心結合型チトクロムサブユニットの滴定データを示す．ここでは $n$＝5 として計算を行っているが，そのうち最も $E_m$ の高い成分 (400 mV 付近) はスペシャルペアによるものである．

本章で例示したのは与えられた酸化還元平衡状態における電子伝達成分の吸収スペクトルを記録していくいわゆる dark titration であるが，閃光照射に伴う吸収変化を測定して滴定を行う場合もある．吸収スペクトルが測りにくい反応中心のキノン・アクセプターを，電子供与体となるスペシャルペアや結合チトクロムの光酸化量によって滴定する場合などがそれにあたる．また，滴定を目的とせずとも特定の酸化還元平衡状態での電子伝達反応を測定するメリットは大きい．こうした閃光照射／時間分解分光測定を行う際に気を付けたいのは，メディエーターによってはサンプルへの電子伝達が非常に速く，閃光照射後の酸化･還元速度を測りたい時などメディエーターによる反応が無視できなくなることである．このことは特に PMS や DAD などを使った場合に顕著で，紅色細菌の膜を使った閃光照射実験では測定する $E_h$ にもよるが数 10 ミリ秒のオーダーで反応中心結合チトクロムへの電子伝達が見られる．一方で電子の授受が遅いメディエーターの場合，測定間隔に注意を払う必要がある．測定データを積算する際などは特に，平衡が元に戻るまで充分な間隔を取ることが大切である．

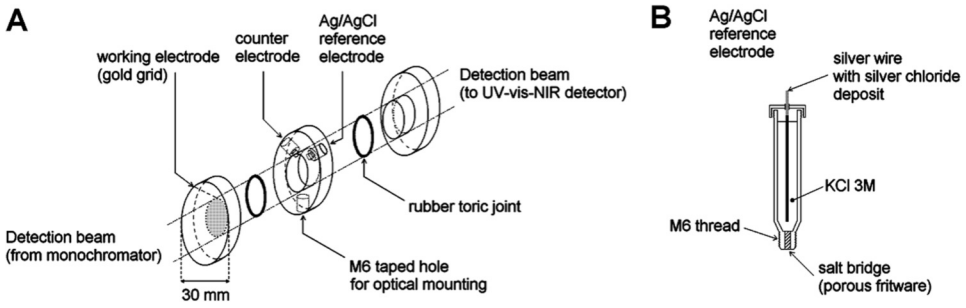



**図 4**：電気化学的方法による酸化還元滴定で用いられる測定セルの例
フランス IBPC-CNRS の Alric 博士から執筆者への提供資料より，許可を得て転載．

## 4.7　電気化学的酸化還元滴定

実際の測定を行う上での酸化還元電位は，基準電極と作用電極の間に生じる電位差によって表されるということはすでに述べた．このことを逆にとらえれば，電極間の電位を制御することができれば測定溶液中の酸化還元状態を任意に調節できることになる．ポテンショスタットというのがそのための装置であり，電極間の電位を任意の値に調節し，その時の電極間に流れる電流値を測るように作られている．つまり電位を変化させていったときに，溶液中の電子伝達物質が電極との間で電子のやり取りをすれば電流値が変化するので，それをモニターすることで $E_m$ を推定することが出来る．ここでは詳しい説明はしないが，その原理や特性について加藤らの解説が分かりやすいので参照されたい[2]．

酸化還元剤を用いる化学的な方法に比べ電気化学的方法が優れているのは測定レンジの広さである．化学的方法でよく酸化剤として使われるフェリシアナイドは 450 mV，あるいはせいぜい 500 mV 程度までしか電位を上げることが出来ないが，電気化学的方法ではそのような限界は無く，これは反応中心のスペシャルペアのように $E_m$ が高い色素団の測定に極めて有利である．電位の制御も化学的方法のような手技的な〝熟練〟は必要無いので，その点も有利である．

電気化学的な酸化還元滴定で最も単純なやり方はポテンショスタットのみを使う方法で，モノヘムのチトクローム等はこれで充分測定できる．しかし酸化還元物質が 2 つ以上となるとそれぞれを見分けることが出来ず，近年はポテンショスタットに光学系を組み合わせた測定が行われるようになってきた[3,4]．図 4 にそのような測定で使われる特殊なセルの一例を示す．このセルは光を通す材質で出来ており，作用電極は極めて薄い金メッシュである．サンプルはその表面に 0.1 mm ほどの厚みを持って配置され，電極との間の平衡が素早く均一に成立するよう考慮されている．測定光は作用電極を通過して検出されることとなる．

## 参考文献

1）P. L. Dutton, Methods Enzymol. **54** (1978) P.411.
2）加藤裕樹，仲村亮正，渡辺正，光合成研究 **17**（2007）p. 63.
3）F. Baymann, D. A. Moss & W. Mäntele, Anal. Biochem. **199** (1991) P.269.
4）S. Bernad & W. Mäntele, Anal. Biochem. **351** (2006) P. 214.
5）Y. Kimura, J. Alric, A. Vermeglio, S. Masuda, Y. Hagiwara, K. Matsuura, K. Shimada & K. V. P. Nagashima, J. Biol. Chem. **282** (2007) P.6463.
6）K. V. P. Nagashima, J. Alric, K. Matsuura, K. Shimada, & A. Vermeglio, Photosynthesis: Fundamental Aspects to Global Perspectives, eds. A. van der Est & D. Bruce, Montreal, Allen Press, 2005, p.325.

# 5．電子伝達活性

沈　　建仁[1)]

光合成の電子伝達反応は，光化学系IIにおいて光照射により水を分解し，得られた電子をチトクロム$b_6/f$複合体を経由して光化学系Iに伝達し，最終的にNADP（NAD）を還元することで終結する．この電子伝達系全体の活性は，電子供与体である水の分解によって放出される酸素量を酸素電極で測定するか，電子受容体であるNADP(NAD)の還元を分光学的に追跡することにより行われる．一方，電子伝達系の反応機構や外部因子による影響を調べるためには，水やNADP(NAD)以外の，人工的な電子供与体及び受容体を加えることによって起こる部分反応を解析することが必要である．また，チラコイド膜を可溶化し，系II及び系I粒子を調製することが簡単にできるので，単離された系IIまたは系I粒子の活性は，やはり外部から電子供与体／受容体を供給して測定する必要がある．これらの解析方法の多くは酸素電極，分光・蛍光測定を用いて行われるが，分光・蛍光測定は第2，第3節で述べられているので，ここでは酸素電極の原理と測定の実際にについて述べるとともに，部分反応の解析に用いられる主な電子供与体・受容体を紹介し，さらに阻害剤や光化学系IIの各種処理法について概説する．

## Electron transfer mediators and inhibitors

Jian-Ren Shen

The principles and practical applications of oxygen electrode in photosynthetic research were described. Subsequently, various artificial electron transfer donors and acceptors useful for measuring photosynthetic electron transfer activities were described.　Finally, various inhibitors of the electron transfer chain, together with the treatments leading specifically to the deactivation of oxygen evolution were mentioned.

## 5.1　酸素電極[1)]

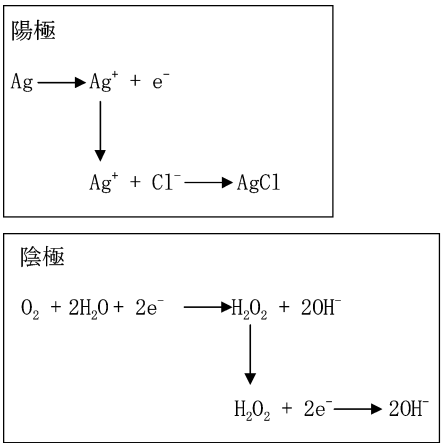
光合成活性を調べるための各種測定法の中でも，酸素電極による酸素発生活性測定は比較的安価な装置で行うことができ，しかも酸素発生反応は光合成の最も特徴的な反応であるので，この反応の活性を測定することは光合成研究に不可欠である．酸素電極は，光合成による酸素発生の量のみでなく，電子受容体との組み合わせによって起きる酸素吸収量も測定することができ，電子伝達鎖全体，あるいは系II，系Iの活性を個別に調べることができる．現在，光合成研究に使われる酸素電極はほとんどポーラログラフ方式のものであり，中でもクラーク型と呼ばれる酸素電極が最もよく使用されている．以下クラーク型酸素電極の原理と液相中での使用法について述べる．気相での酸素電極の使用については第2章を参照すること．

1）岡山大学大学院自然科学研究科

### 5.1.1　酸素電極の原理

酸素電極の陽極（銀）はあらかじめ飽和KCl溶液に浸しておき，陰極（白金）との間に薄い電解質（通常KCl）でつないでおく．電圧印加により，陽極と陰極でそれぞれ次の反応が起き，電流が流れる．

一定電圧をかけたときに流れる電流は，陰極での電解



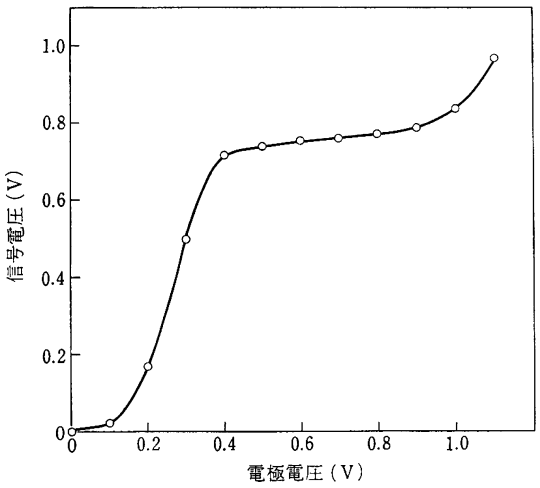



**図5.1**：酸素電極の印加電圧と流れる電流（電圧に変換）の関係

質反応の速度，すなわち，酸素濃度に比例するので，この原理を利用して，光照射による試料中の酸素濃度の変化を測定する．このためには，印加電圧が変化しても流れる電流が一定であることが望ましい．印加する電圧（電極電圧）と流れる電流（電圧に変換）の関係を図5.1に示す．電極電圧が0.4-0.9 Vの間で流れる電流がほぼ一定であるので，この間で流れる電流が溶存酸素量と比例することになる．従って電極電圧は，通常多少の変動があっても流れる電流が変動しない領域の中央値，約0.60〜0.65 Vを使用する．

酸素電極にかける電圧と信号取り出しのための電気回路を図5.2 Aに示す．可変抵抗R 1は電極にかける電圧の調整用，R 2は酸素濃度に比例して流れる電流を電圧に変換し検出するのに用いる（ゲーン調整用，電極電圧の調整にも使われる）．得られた信号は増幅器で増幅してモニターするが，通常は飽和酸素濃度に対して光合成反応による酸素量の変化が小さいので，酸素電極から取り出した電圧に対して，溶存酸素量に匹敵する一定の逆電圧をかけることによってこの分の電圧をキャンセルし，光による酸素濃度変化に対応する電圧変化を記録する．これによって記録計のレンジを拡大して測定できるようになる．逆電圧をかける装置はオフセットまたはバッキング装置と呼び，その回路を図5.2 Bに示した．バッキング回路が付いた記録計も利用可能である．また，記録計の代わりに信号をコンピューターに取り入れ，それをデジタルデータとして記録・保存するA/Dコンバーター，ソフトウェアも発売されている．

酸素電極の陰極は他の陰イオンとも反応し電流を流してしまうので，クラーク型電極ではその表面をテフロン膜など，酸素は通過するが他のイオンは通過しない膜で覆うことで，電極液（反応液）と測定液を分離している．実際には測定液の酸素濃度と平衡状態にある反応液の酸素濃度を測定することになるので，測定時には十分な攪拌が必要である．クラーク型の酸素電極は市販のものとして，ランクブラザーズ，ハンザテック社などのものがあり，筆者の研究室ではハンザテックのものを使用している．その電極と測定セルを図5.3に示す．

クラーク型電極は連続光照射による光合成試料の酸素発生を測定するのに十分な感度を有しているが，閃光照射による微量の酸素を検出するには感度が不十分である．このため，陰極の電極面を大きくし，感度を向上させたJoliotタイプ電極が作られている[2,3]．これを用いることで閃光照射による酸素発生量の振動パターンや，Mnクラスターの$S_2$, $S_3$状態の寿命を測定することができる．

### 5.1.2　酸素電極使用の実際

電極反応は温度に非常に敏感であり，また，水の溶存酸素量と試料の光合成速度も温度に依存するので，測定液の温度を一定に保つよう，恒温水で反応容器の周りを循環させる必要がある．市販の反応容器は恒温水が循環できるようになっているが，恒温水循環装置を別途用意する必要がある，恒温循環器とセットした反応容器もハンザテック社から発売されている．光照射による電極の

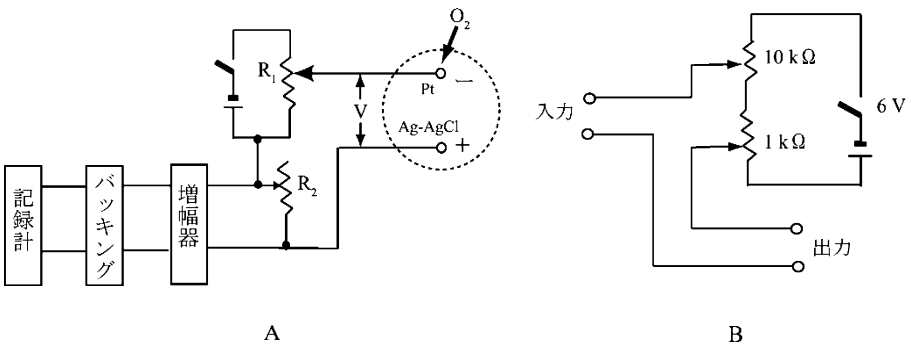



**図5.2**：酸素電極（A）とバッキング装置の回路図（B）

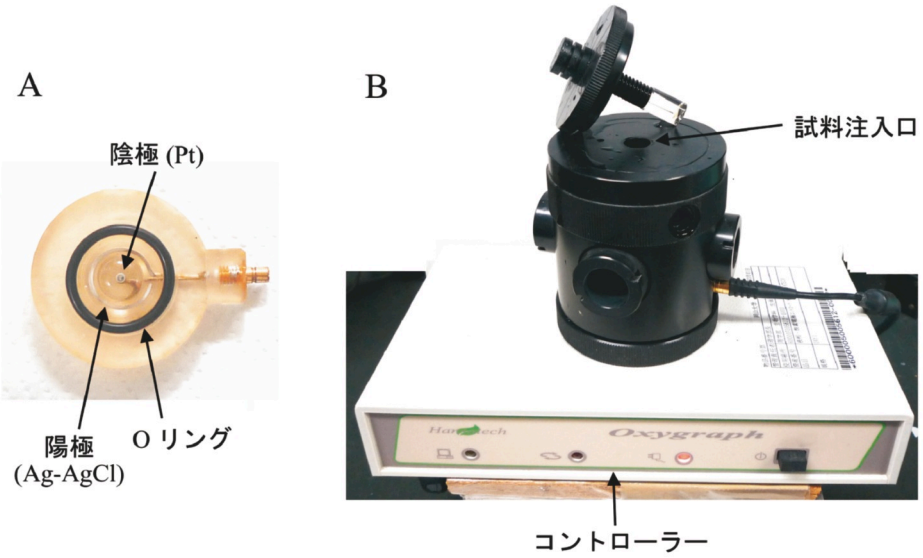



**図 5.3**：ハンザテック社の酸素電極．A．酸素電極本体；B．電極を装着した測定セル．

温度上昇を防ぐ必要もある．そのため，光源からの光を 5-10 cm の水槽または熱線カットオフフィルター，及び赤外線フィルターを通して使用する．

回転子の速度も電流値に影響を与える．回転子の速度が小さいと，電流値が小さく，回転子の速度を増加させると，電流値も増加し，やがて一定になるので，この一定になる回転速度を使用する．回転速度をさらに大きくすると，過度の撹拌によるノイズが生ずる恐れがある．

一定温度での水の飽和酸素濃度を表 5.1 に示す．流れる電流は基本的に溶存酸素量に比例するが，電極の汚れその他の原因により，溶存酸素量が O でも一定の電流が流れる．測定の前には酸素が O と飽和濃度に対応する電流値（電圧に変換）をチェック（キャリブレーション）しておく必要がある．以下酸素電極の用意とそのキャリブレーションについて述べる．

### 酸素電極のセット

以下ハンザテック社のものを例に説明する．ランクブラザーズ社のものについても基本的に同じである．

1．長時間使用した電極の表面は汚れが溜まっている可能性があるので，よく洗ってから乾かしておく．電極を傷つけないよう洗剤で洗うのもよいが，汚れがひどい場合は，専用の粉末洗剤で電極表面を軽く磨くか，粉末洗剤の代わりに，やわらかい歯磨き粉で磨くとよい．磨いた後は液体洗剤または水でよく洗ってすすいでおく．

2．乾いた陽極（Ag）の回りに O リングをセットし，陽極と陰極の上に飽和 KCl を数滴ずつたらす．円形に切ったタバコ紙をのせ，陰極（Pt）の上に 1 滴の飽和 KCl をたらし，タバコ紙より若干小さく切ったテフロン膜を重ね，O リングをのせ，その上からアプリケーターを用いて O リングがフィットするようにセットする．

3．セットした電極をサンプルホルダーにフィットさせ，水漏れがないようしっかり固定する．電極のリード線をつなぎ，反応容器に水を入れ，撹拌しながら電流値（電圧）が安定するまで待つ．通常は 30 分－1 時間で電極が安定するが，場合によっては 1 日待つこともある．この場合はテフロン膜のセットは測定の 1 日前から行っておく必要がある．

4．テフロン膜のセットがうまくできているかどうかは，以下に示すキャリブレーション時に，信号のノイズは十分小さいか，異常なドリフトはないか，ジチオナイトを添加したときの酸素濃度の減少速度は適当か（通常は数秒で最小値まで減少する）などで判断する．一旦セットしたテフロン膜は乾かさないよう常に水溶液に浸しておく．きちんとセットしたテフロン膜は 1 週間程度そのまま使用できる．長時間使用しない電極

**表 5.1**：1 気圧の空気と平衡になった蒸留水中の酸素濃度（飽和酸素濃度）[4]

| 温度（°C） | 0 | 5 | 10 | 15 | 20 | 25 | 30 | 35 | 40 | 45 | 50 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 酸素濃度（$\mu$M） | 442 | 386 | 341 | 305 | 276 | 253 | 235 | 220 | 206 | 192 | 176 |

は，よく洗ってから乾燥状態で保存する．

キャリブレーション

1．恒温水槽を測定温度に設定する．測定用バッファーも恒温槽に入れ，測定温度に保っておく．
2．測定セルに適当量の水を入れ，攪拌しながら空気を取り込み，出力電圧が一定になるまで待つ（通常5分から10分）．この電圧値が設定した温度における，空気と平衡した水の飽和酸素濃度に対応するものである．
3．ジチオナイト（$Na_2S_2O_4$）をミクロスパーテルで少量加え，ふたを水面との間に空気層がなくなるまで挿入し，電圧が下がるのを待つ（数秒～1分程度）．電圧が十分下がり，安定したらその値を酸素濃度0の時の出力電圧とする．この電圧値と飽和酸素濃度の電圧値との差が，設定温度の飽和酸素濃度（例えば，25°Cの場合は253 $\mu$M）に相当する．
4．ジチオナイトを十分洗い落とす．ハンザテック社の専用ソフトウェアを使用する場合は，再度水を充填してから飽和酸素濃度の電圧値を測定し，その値は自動で酸素濃度に変換される．

実際の測定

1．キャリブレーション終了後，測定セルの水をアスピレーターあるいは先端を柔らかいシリコンチューブで保護したパスツールピペットで吸い取り，全量2 mlになるように，測定セルにバッファー，電子受容体，試料の順に加え，空気層がなくなるまでふたを挿入する．
2．スターラーを回転し，記録計をスタートさせ，出力信号（電圧）が安定になるまで待つ（1−2分程度，これより長くなると，試料の失活を考慮する必要がある）．
3．測定セルに飽和光を照射し，1−2分ほど測定した後，光照射を止め，暗黒のまましばらく記録計を動かし続け，光照射を止めた後の電圧が安定かどうかを確認する．
4．光照射をONした直後の電圧信号の傾きから，酸素発生の活性（$\mu$moles $O_2$/mg chl/mlとして表す）を計算する．光照射前と照射後の電圧信号（ベースライン）が一定でなければ，それらの傾きも計算に入れる．
5．測定セルの試料を捨て，蒸留水で数回，テフロン膜を傷つけないようセル内を洗浄し，蒸留水で満たして保管する．長期間（1週間以上）使用しない時は電極を解体し，乾燥状態で保管する．

## 5.2 電子受容体と供与体[1,5)]

細胞や〝intact〟葉緑体の場合は，$CO_2$（$NaHCO_3$）を電子受容体として電子伝達鎖全体の活性を酸素電極で測定することができる．一方，単離したチラコイド膜，系II，あるいは系I標品を用いた場合，あるいは電子伝達の部分反応の活性を知りたい場合，外部から各種電子受容体及び供与体を加えて測定する必要がある．外部から与えられた電子担体は主に(1)酸化還元電位，(2)反応部位への接近の容易さによって電子伝達鎖のさまざまな成分と反応する．電子供与体と受容体を同時に加えて測定する時には，供与体と受容体同士で起こりうる化学反応に注意する必要がある．全電子伝達鎖，及び光化学系II，系Iに使われる主な供与体，受容体の作用部位を図5.4に示し，その使用例を表5.2に示した．

どの供与体，受容体を使用するかは，使用する試料の種類，測定したい部分反応によって決まる．一般に，細胞，〝intact〟葉緑体には細胞膜，葉緑体包膜があるため，脂溶性のキノン類は反応部位に到達することが可能で使用できるが，水溶性の電子担体は使用できない．これらの試料では光リン酸化と共役しており，Mg，ADP，Piを添加しないと電子伝達速度が低いが，1-2 mM $NH_4Cl$のような脱共役剤の添加により活性が著しく増加する．チラコイド膜は系IIと系Iの受容体側がストロマ側に露出しているので，それらの部位で電子を受け取ることができる受容体は使用できるが，ルーメン側に存在する系IIと系Iの電子供給側で電子を供給するには，膜を通過することが可能な脂溶性の供与体は機能を果たすことができるが，水溶性の供与体は使用できない場合がある．

反応液の組成やpHも試料に応じて選択する必要がある．一般に葉緑体やチラコイド膜における電子伝達鎖全体の活性や単離した系Iの活性は至適pHが7～8であるが，系IIにとっての至適pHは6.0-6.5である．電子伝達鎖全体の活性は特にイオンを必要としないが，通常5-10 mM $MgCl_2$，10-20 mM NaClの存在下で測定することが多い．一方，系IIの酸素発生複合体には$Ca^{2+}$，$Cl^-$イオンが結合しており，これらのイオンは遊離しやすいので系IIの酸素発生活性を測定する時は$Ca^{2+}$，$Cl^-$イオンを添加して行う．特にシアノバクテリアではチラコイド膜でも$Ca^{2+}$，$Cl^-$イオンの存在下で測定した方がよい．

光照射は，光強度に対する光合成活性の依存性を解析する以外は飽和光を用いなければならず，市販のハロゲンランプを光源とした「コールドライト」などが利用できる．「コールドライト」と言っても強い光強度下ではか

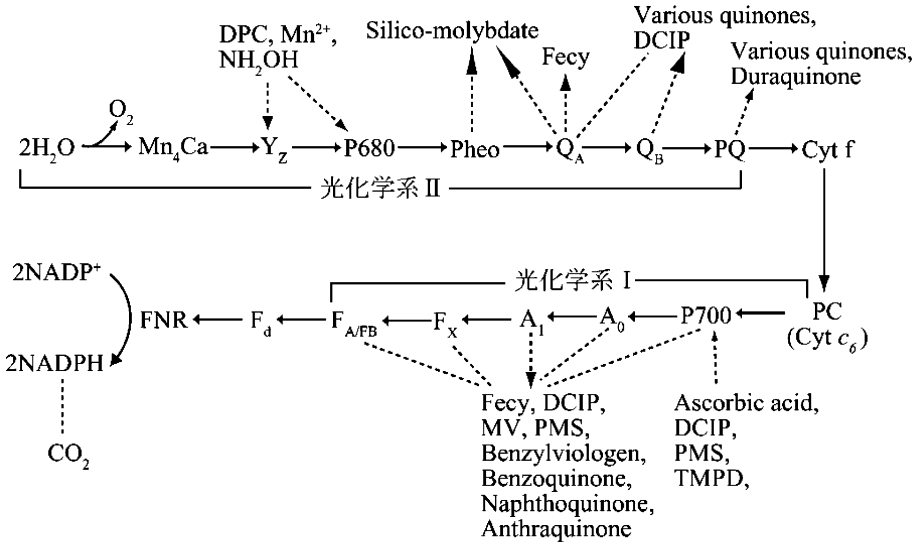



**図 5.4**：光合成電子伝達系と主な電子受容体，供与体の作用部位．矢印は電子の流れを示し，破線は電子受容体または供与体への電子の受け渡しを示す．矢印のない破線は電子の流れが必ずしも確定されていないこと，あるいは電子伝達の速度が必ずしも最適でないことを示す．略語：DPC, dephenylcarbazide; DCIP, 2, 6-dichlorophenolindophenol; Fecy, potassium ferricyanide; MV, methyl viologen (paraquat); PMS, phenazine methosulfate; TMPD, N, N, N', N'-tetramethyl-*p*-phenylenediamine.

**表 5.2**：代表的な電子受容体と供与体の使用例

| 略称 | 名称 | 作用部位と機能 | 溶媒 | 使用濃度 | ストック濃度 |
|---|---|---|---|---|---|
| 炭酸水素ナトリウム | sodium bicarbonate（$NaHCO_3$） | 全電子伝達鎖受容体 | 水 | 5 mM | 2 M |
| NADP* | nicotinamide adenine dinucleotide phosphate | 全電子伝達鎖受容体 | 水 | 0.2 mM | 20 mM |
| DCBQ | 2, 6-dichlorobenzoquinone（2, 5-dichlorobenzoquinone） | PSII 受容体 | エタノール | 0.4–1.0 mM | 40 mM |
| DMBQ | 2, 6-dimethylbenzoquinone（2, 5-dimethylbenzoquinone） | PSII 受容体 | エタノール | 0.4–1.0 mM | 40 mM |
| PPBQ | phenyl-*p*-benzoquinone | PSII 受容体 | エタノール | 0.4–1.0 mM | 40 mM |
| DCIP | 2, 6-dichloroindophenol | PSII（PSI）受容体 | 水 | 0.1–0.2 mM | 20 mM |
| Fecy | potassium ferricyanide | PSII（PSI）受容体 | 水 | 1–2 mM | 200 mM |
| MV | methyl viologen | PSI 受容体 | 水 | 1–2 mM | 200 mM |
| ナフトキノン | 1, 4-naphthoquinone | PSI 受容体 | エタノール | 0.05 mM | 10 mM |
| DPC | diphenylcarbazide | PSII 供与体 | エタノール | 0.5–1 mM | 200 mM |
| ヒドロキシアミン | hydroxyl amine（NH2OH） | PSII 供与体 | 水 | 1–2 mM | 200 mM |
| 還元型 DCIP | Ascorbate＋DCIP | PSI 供与体 | 水 | Asc. 10 mM＋DCIP 0.1 mM | Asc. 1 M，DCIP 20 mM |

*NADP を電子受容体とする場合，必要に応じて Fd，Fd-NADP 酸化還元酵素（FNR）を添加する必要がある．

なりの熱が発生するので，熱線カットフィルターや 10 cm 程度の水槽を通すことで熱をカットする．さらにイェローフィルターなどを通してクロロフィルやフィコビリンなどに吸収される長波長側の光を使うと安全である．光が飽和しているかどうかを簡単に確認するには，ニュートラルフィルターを用いて光強度を 80–90%に下げた時に活性が減少しないか確認すればよい．

酸素電極や分光学的手法で電子伝達の活性を測定する時は，通常葉緑体やチラコイド膜は 10–20 $\mu$g chl/ml，精製した系 II や系 I 粒子は 5–10 $\mu$g chl/ml の濃度で行う．より高濃度で測定する場合，chl による自己吸収や攪拌が不十分による酸素濃度のムラや吸光度の変動に由来するノイズに注意する必要がある．より低い濃度で測定する場合は，活性が低いために測定の誤差が相対的に大きくなる可能性がある．以下全電子伝達鎖，光化学系 II，光化学系 I の順にそれぞれの活性測定について述べる．

### 3.2.1　全電子伝達鎖

細胞，〝intact〟葉緑体，チラコイド膜における全電子伝達鎖の活性は，電子供与体として水，電子受容体として $CO_2$（$NaHCO_3$），$NADP^+$，ベンゾキノン，アントラキノンを用いて，酸素電極で測定することができる．$NADP^+$ を受容体として用いる場合は，その光による還元で生成される NADPH 量を 340 nm の吸収増大で測定することができる（NADPH の 340 nm でのモル吸光係数は $6.2 \times 10^3 M^{-1}cm^{-1}$ である）．さらにメチルビオロゲン（MV）を電子受容体として用い，酸素電極で酸素吸収量を測ることで測定できる．キノン類や Fecy（potassium ferricyanide，フェリシアン化カリウム），DCIP（2, 6-dichloroindophenol）を電子受容体として用いる場合は，系 II からも電子を受け取る可能性があるので，系 II 由来の活性を考慮する必要があり，実質的に全電子伝達系の活性を測定するのは難しい．以上の電子受容体のうち，$CO_2$（$NaHCO_3$）以外は全電子伝達系の活性は膜電位の形成によって律速されるので，電子伝達系の活性のみを調べる場合は，2 mM $NH_2Cl$ や 10 mM メチルアミンなどを脱共役剤として添加して測定を行う．

**[実験例 1]**

シアノバクテリア細胞の全電子伝達鎖活性の測定

酸素電極を用意し，測定セルに 2 ml の BG11 培地を入れ，10 $\mu$g chl/ml になるよう細胞を加え，2 M のストック溶液から 5 mM $NaHCO_3$ になるよう加え，光照射による酸素濃度の増加を測定する．得られた値を $\mu$moles $O_2$/mg chl/hr に換算して，炭酸固定と共役した全電子伝達鎖の活性を決定する．活性が低く，誤差が相対的に大きいような場合は，測定液の試料濃度を 15–20 $\mu$g chl/ml 程度に増やす（20 $\mu$g chl/ml 以上の濃度はできるだけ避けた方がよい）．この方法は炭酸固定能を保持した〝intact〟葉緑体についても使用可能である．

**[実験例 2]**

シアノバクテリア及び高等植物のチラコイド膜の全電子伝達鎖活性の測定

2 ml の測定用バッファー（たとえば，0.4 M sucrose，40 mM Hepes（pH 7.0），10 mM NaCl，5 mM $MgCl_2$）に 10 $\mu$g chl/ml になるようシアノバクテリアまたは高等植物のチラコイド膜を加え，さらにそれぞれのストック溶液から最終濃度が 1 mM KCN，1 mM MV になるよう加え，光照射による酸素吸収量を測定する．この方法では，水の分解によって生じた電子が，光化学系 II，系 I を経由して MV に渡され，還元された MV はさらに酸素を還元し過酸化水素を生成する．KCN は過酸化水素の分解を触媒するカタラーゼを阻害するためのものである（KCN は 10 倍の濃度ではプラストシアニンから PSI への電子供給を阻害するので注意すること）．1 分子の MV は 1 分子の酸素を還元し，酸素が 4 分子還元されれば 2 分子の過酸化水素と 2 分子の酸素になる．従って，光化学系 II で 2 分子の水が分解され，1 分子の酸素が発生すると，電子伝達系に 4 電子が流れ，MV によって 2 分子の酸素が吸収され，全体としては 4 電子あたり 1 分子の酸素が吸収されることになる．即ち，電子当量としては酸素発生と同じ値でマイナスのものになる．

上記の測定で高等植物のチラコイド膜を用いた場合は，脱共役剤として 2 mM $NH_4Cl$ または 10 mM メチルアミンを添加することで活性が増加する．シアノバクテリアから単離されたチラコイド膜は多くの場合〝脱共役〟の状態にあるので，特に脱共役剤を添加しなくてもよい．しかし，シアノバクテリアから単離されたチラコイド膜はしばしば系 I の電子供与体であるシトクロム $c_6$（$c_{553}$）が脱離するので，全電子伝達鎖の活性が高くないかもしれない．MV は細胞膜を透過するので，シアノバクテリアの生細胞の全電子伝達鎖，あるいは適当な電子供与体との組み合わせで光化学系 I の活性をこの方法で測定することも可能である．

### 5.2.2　光化学系 II

光化学系 II の電子受容体として最もよく使われるのは，PPBQ（phenyl-*p*-benzoquinone），2, 6-DCBQ（2, 6-dichlorobenzoquinone），2, 5-DCBQ（2, 5-dichlorobenzoquinone），2, 5-DMBQ（2, 5-dimethylbenzoquinone），BQ（benzoquinone）などの各種キノン類で，主に $Q_B$ から電子を受け取る．$Q_B$ 部位が損傷を受けた場合は Fecy がよい受容体になる．DCIP も $Q_A$，$Q_B$ 両方からの電子受容体として用いられる．特に酸素電極が利用できない，あるいは酸素発生活性が失われた場合，DPC（diphenylcarbazide）を電子供与体とし，DCIP の光還元を 600 nm で測定することで光化学系 II の活性を評価することが有効である．一方，系 II の酸化側では，通常水が電子供与体となるが，酸素発生複合体が損傷を受けた場合，DPC，$NH_2OH$，$Mn^{2+}$ などが電子供与体として使用することができるが，このうち，$NH_2OH$，$Mn^{2+}$ は DCIP をゆっくり還元させるので，実質的には DPC が最も有効な電子供給体である．

**[実験例 1]**

光化学系 II 膜断片（BBY 標品）酸素発生活性の測定

酸素電極を用意し，2 ml の測定バッファー（0.4 M

sucrose，40 mM Mes(pH 6.0)，10 mM NaCl，5 mM $CaCl_2$)に 0.4 mM PPBQ を入れ，ホウレンソウ BBY 標品を 10 μg chl/ml になるよう加え，光照射による酸素濃度の変化量を測定する．測定バッファーの $Ca^{2+}$ イオンは酸素発生系が損傷を受けているかどうかの指標であり，損傷を受けていない高等植物の BBY 標品の活性測定には $Ca^{2+}$ イオンが必要ないが，コア標品やシアノバクテリアの系II標品は $Ca^{2+}$ イオンがないと活性が低くなる．電子受容体として，PPBQ 以外に，2, 6-DCBQ，2, 5-DMBQ がほぼ同じ活性を与える．チラコイド膜や葉緑体でも，プラストキノンから系Iへの電子供給を阻害する DBMIB（2, 5-dibromo-3-methyl-6-isopropyl-*p*-benzoquinone）の添加により，この方法で系IIの活性を測定することができる．コア標品やシアノバクテリアの系II標品には，1 mM Fecy を同時に入れた方がより高い活性が得られる．

**[実験例 2]**

酸素発生活性を失った光化学系IIの活性測定

光化学系IIの酸素発生活性は，トリスなどの各種処理，各種ストレスによって簡単に失われる．このように酸素発生能を失った光化学系IIの電子伝達活性は，DPC を電子供与体，DCIP を電子受容体として測定することができる．還元された DCIP の定量は，600 nm での吸光度変化により行われる(600 nm での DCIP のモル吸光係数は $1.9 \times 10^4 M^{-1}cm^{-1}$)．通常の分光光度計を用いて，試料セルの側面，測定光と直角の方向から光照射を行い，600 nm での吸光度変化を追跡する．

3 ml の測定バッファー(0.4 M sucrose, 10 mM NaCl, 5 mM $MgCl_2$）に，1 mM DPC，0.2 mM DCIP を加え，20 μg chl/ml になるよう試料を入れ，攪拌しながら光照射による 600 nm での吸光度変化を測定し，DCIP のモル吸光係数から活性を求める．DCIP の還元は 2 電子反応なので，測定された活性は酸素発生活性の 2 倍に相当する．チラコイド膜や葉緑体標品も，光化学系Iの活性を阻害すればこの方法で系IIの活性が測定できる．

### 5.2.3 光化学系I

系Iの電子受容体としては，メチルビオロゲン(MV)，各種キノン，DCIP，Fecy がある．一方，系Iの供与体として，還元型の DCIP，PMS（phenazine methosulfate），TMPD（N, N, N' N' -tetramethyl-p-phenylenediamine）を用いるが，それらの還元型を作るには，高濃度のアスコルビン酸と合わせて使用する．さらにチラコイド膜などで系Iのみの活性を測定する場合，系II由来の電子を DCMU (3-3, 4-dichlorophenyl)-1, 1-dimethylurea)で阻害しておく必要がある．

**[実験例]**

チラコイド膜の系I活性の測定

酸素電極のセルに 2 ml の測定バッファー（0.4 M sucrose，40 mM Hepes（pH 7.0），10 mM NaCl，5 mM $MgCl_2$）を入れ，最終濃度 2 mM アスコルビン酸ナトリウム，0.1 mM DCIP，0.2 mM MV，1 mM KCN，10 μM DCMU を加え，光照射による酸素濃度の減少を測定する．必要であれば脱共役剤として 2 mM $NH_4Cl$，または 10 mM メチルアミンなどを加える．MV は 4 分子還元されれば 4 分子の酸素を還元し，それらが酸素ラジカル $O_2^-$ を経由して 2 分子の過酸化水素と 2 分子の酸素になるので，ネットとしては 2 分子の酸素が吸収されることになる．従って，これによって測定される酸素吸収の活性は，系IIにおける酸素発生活性の 2 倍に相当する．しかし，アスコルビン酸の存在下では，酸素ラジカル $O_2^-$ は過酸化水素まで還元されるが酸素を作らないので，見かけの酸素吸収量は 4 電子あたり 2 分子よりも著しく大きくなる．これを避けるため，過剰量の SOD(superoxide dismutase) を添加して酸素ラジカル $O_2^-$ からの過酸化水素と酸素への分解を促進する必要がある[5]．なお，KCN はカタラーゼを阻害することで生成された過酸化水素の分解を防ぐためのものである．

## 5.3 阻害剤[6]

阻害剤は電子伝達系の特定のステップを阻害する薬剤であり，その作用様式は主に 2 種類に分けられる．すなわち，(1)電子伝達体と競合して，その結合する部位に結合することで電子伝達を阻害する；(2)電子伝達体の結合部位あるいはその周辺の構造を破壊することで電子伝達を阻害する．光合成電子伝達系の主な阻害剤の作用部位を図 5.5 に示し，典型的な阻害剤の使用例を表 5.3 に示した．

タイプ(1)の阻害剤として，光化学系IIでは還元側にある $Q_B$ 結合部位に特異的に結合する DCMU，アトラジン，トリアジン，シマジン，*o*-フェナンスロリン，HOQNO (2-heptyl-4-hydroxyquinoline oxide) などがあり，例えば，チラコイドや生細胞で光化学系Iの活性のみを測定する場合，10 μM DCMU を添加して系IIの活性を阻害しておく手法はよく用いられる．光化学系II型（$Q_AQ_B$ 型）反応中心を持つ光合成細菌の場合は *o*-フェナンスロリンが阻害剤として用いられる．アトラジンはその $Q_B$ 部位への結合の特異性と $^{14}C$ 同位体標識による

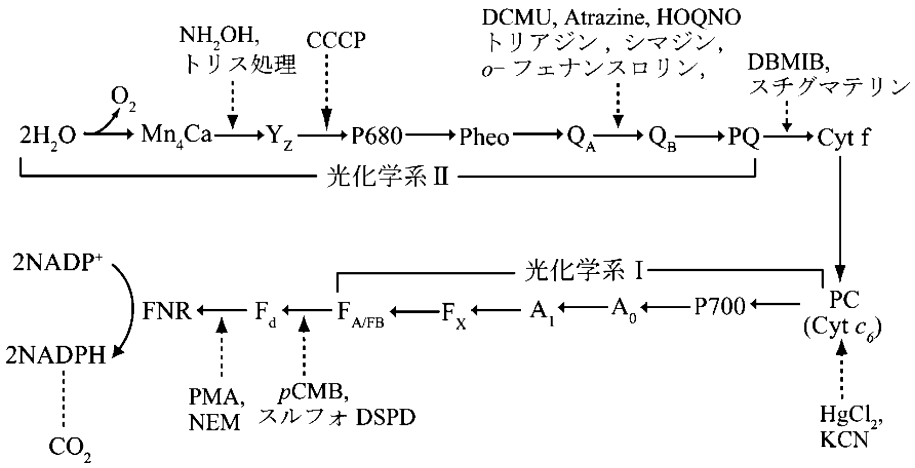
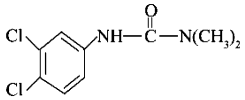
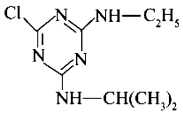
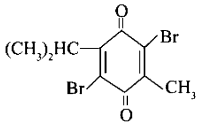
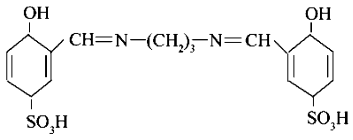



**図 5.5**：光合成電子伝達系に対する各種阻害剤の作用部位（矢印の付いた破線で表してある）．略語：CCCP, carbonylcyanide *m*-chlorophenyl-hydrazone; DCMU, 3-(3, 4-dichlorophenyl)-1, 1-dimethylurea; HOQNO, 2-heptyl-4-hydroxyquinoline oxide; *p*CMB, p-chloromercuribenzoate; PMA, phenyl-mercuribenzoate; NEM, *N*-ethylmaleimide;スルフォDSPD, disulfo-disalicylidenepropanediamine.

**表 5.3**：光合成電子伝達系の阻害剤の使用例

| 阻 害 剤 | 溶媒 | 使用例 |
|---|---|---|
| DCMU<br>(3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea)<br>  | エタノール | 10 μM |
| Atrazine<br>  | エタノール | 10 μM |
| DBMIP<br>(2,5-dibromo-3-methyl-6-isopropyl-*p*-benzoquinone)<br>  | エタノール | 5 μM |
| Sulfo-DSPD<br>(disulfodisalicylidenepropanediamine)<br>  | 水 | 1 mM |
| HgCl2 | 水 | 10 mM |
| KCN | 水 | 10 mM |

定量分析が可能であることから，シアノバクテリアの生細胞中での系IIを定量することにも利用される．系Iの電子供給側では，DBMIBとスチグマテリンが阻害剤としてよく用いられ，それらはシトクロム $b_6f$ のプラストキノン結合部位に結合して，還元型プラストキノンの酸化を防ぐことで電子伝達を阻害する．DBMIBは10 μM以上の濃度では光化学系Iに直接電子を供給するので注意が必要である．アンチマイシンAは光合成細菌の電子

伝達系で働くシトクロム $bc_1$ 複合体を特異的に阻害するが，シトクロム $b_6f$ では有効な阻害剤ではない．

タイプ(2)の阻害剤としては，光化学系IIの酸素発生複合体中のMn原子を遊離させるヒドロキシアミン，トリス処理，熱処理（これらの作用については次節を参照），P 680への電子供給を阻害するCCCP (carbonylcyanide *m*-chlorophenyl-hydrazone)，系Iの電子供給側を阻害する $HgCl_2$，KCN（炭酸固定を阻害する濃度の数十倍の濃度），及び系Iの還元側を阻害するスルフォDSPD (sulfo-disalicylidenepropanediamine)，PMA (phenyl-mercuribenzoate)，NEM(*N*-ethylmaleimide)，*p*CMB (*p*-chloromerrcuribenzoate)，などがあげられる．このうち，CCCPは脱共役剤であるが，10–100倍高い濃度で用いると阻害剤になる．$HgCl_2$ とKCNはプラストシアニン中の銅を遊離させることで系Iへの電子供給を阻害するが，$HgCl_2$ は系IIの酸素発生反応も阻害するので注意が必要である．*p*CMBはフェレドキシンの阻害剤として，PMA，NEMはフェレドキシン—$NADP^+$ オキシドレダクターゼ（FNR）の阻害剤として用いられるが，PMAやNEMはフェレドキシンを阻害する場合もあるので注意が必要である．

電子伝達反応と光リン酸化反応（ATP合成反応）を切り離すための薬剤は脱共役剤として知られている．これらの薬剤はチラコイド膜を介したプロトンの電気化学的ポテンシャルを解消することによって，ATP合成に必要な駆動力をなくし，ATP合成反応を阻害する．通常，生細胞や葉緑体では光合成電子伝達系は光リン酸化反応と共役しているので，全電子伝達鎖の速度はATP合成反応によって律速されているが，脱共役剤の使用によって全電子伝達鎖の速度を著しく促進することができ，電子伝達系の活性のみを分析する時には脱共役剤の使用が不可欠である．よく用いられる脱共役剤として，ナイジェリシン，バリノマイシン，FCCP(カルボニルシアニド*p*-トリフルオロメトキシフェニルヒドラゾン)，グラミシジンA，アラメシチン，$NH_3$，$NH_4Cl$，などがある．

## 5.4 トリス処理などによる光化学系IIの失活と再活性化

光化学系IIの酸素発生反応は電子伝達系の中でも最も失活しやすい部位であり，各種処理によって活性が失われることが知られている．系IIの酸素発生反応を失活させる処理とそれらの作用機構を表5.4にまとめた．これらの処理の作用機構は4つに分けられる：(1)系II表在性タンパク質の全部または一部を遊離させる；(2)Mnを遊離させる；(3)表在性タンパク質とMnを同時に遊離させる；(4)Mnと表在性タンパク質には影響しないが，Mnクラスターの Caのみを遊離させる．(1)に属するのは高塩濃度による処理で，例えば，1 Mの一価カチオンであるNaClは高等植物系IIの23 kDa，17 kDaタンパク質を遊離させるが，33 kDaタンパク質は遊離しなく，Mnも結合したままである．このように処理した高等植物の系IIは数mMの $Ca^{2+}$，$Cl^-$ 存在下で未処理系IIとほぼ同じ酸素発生活性を示す．1 Mの二価カチオンである $CaCl_2$ や $MgCl_2$ で処理すると，33 kDaを含む3つの表在性タンパク質が遊離し，酸素発生活性が著しく低下する．(2)の処理に属するのはヒドロキシアミンであるが，場合によっては表在性タンパク質の一部または大部分を脱離させるので注意が必要である．(3)は熱処理やトリス処理があげられ，特にトリス処理はMnと表在性タンパク質の両方を遊離させる処理として，高等植物のチラコイド膜，系II標品，あるいはシアノバクテリアの系II標品に広く使われている．(4)は単離した高等植物の系II標品に特異的に働く方法で，pH 3.0のバッファーで5分程度処理することによってMnクラスターに結合しているCa原子のみが脱離する．

表在性タンパク質のみが脱離した場合は，脱離した表在性タンパク質を系IIと混合することで再結合させ，

**表5.4**：光化学系II酸素発生反応を阻害する各種処理

| 処理 | 作用機構 | 文献 |
|---|---|---|
| 1 M Tris，pH 8.0 | Mnと表在性タンパク質を脱離 | 10，11 |
| 1 M $CaCl_2$（$MgCl_2$） | 3つの表在性タンパク質を脱離させるが，Mnは遊離しない | 12，13 |
| 1 M NaCl | 高等植物の系IIの表在性23 kDa，17 kDaタンパク質のみを脱離，シアノバクテリア系IIには効果なし．Mnは遊離しない． | 14，15 |
| 2–10 mM $NH_2OH$ | Mnを還元して遊離させる．表在性タンパク質も部分的に脱離 | 16 |
| 100 citric acid，pH 3.0 | 高等植物の系II Mnクラスターの Caを脱離，シアノバクテリア系IIには効果なし．Mnと表在性タンパク質は遊離しない． | 17 |
| 熱処理 | 表在性タンパク質を優先的に脱離させるが，場合によってはMnも脱離． | 18 |

PSII を再構成し，酸素発生を回復させることができる[7,8]．一方，トリス処理やヒドロキシアミン処理のような，Mn を脱離させた場合，電子受容体である DCIP や Fecy の存在下で弱い光照射によって Mn を酸化してから再結合させることが必要であり，これは光再活性化と呼ばれる手法である[9]．

## 参考文献


1）加藤栄，宮地重遠，村田吉男編，光合成研究法，共立出版，1981．
2）P. Joliot, & A. Joliot, Biochim. Biophys. Acta **153** (1968) 625.
3）P. Joliot, Photosynth. Res. **76** (2003) 65.
4）G. A. Truesdale, & A. L. Downing, Nature **173** (1954) 1236.
5）S. Izawa, Methods in Enzymol. **69** (1980) 413.
6）A. Trebst, Methods in Enzymolo. **69** (1980) 675.
7）A. Seidler, Biochim. Biophys. Acta **1277** (1996) 35.
8）I. Enami, S. Yoshihara, A. Tohri, A. Okumura, H. Ohta, & J.-R. Shen, Plant Cell Physiol. **41** (2000) 1354.
9）G. M. Cheniae & I. F. Martin, Biochim. Biophys. Acta **253** (1971) 167.
10）Y. Yamamoto, M. Doi, N. Tamura, & M. Nishimura, FEBS Lett. **133** (1981) 265.
11）T. Kuwabara, & N. Murata, Plant Cell Physiol. **24** (1983) 741.
12）T. Ono, & Y. Inoue, FEBS Lett. **164** (1983) 255.
13）T. Ono, & Y. Inoue, FEBS Lett. **166** (1984) 381.
14）H.-E. Åkerlund, C. Jansson, & B. Andersson, Biochim. Biophys. Acta **681** (1982) 1.
15）M. Miyao, & N. Murata, Biochim. Biophys. Acta **725** (1983) 87.
16）N. Tamura, & G. M. Cheniae, Biochim. Biophys. Acta **809** (1985) 245.
17）T. Ono, & Y. Inoue, FEBS Lett. **227** (1988) 147.
18）I. Enami, M. Kitamura, T. Tomo, Y. Isokawa, H. Ohta, & S. Katoh, Biochim. Biophys. Acta **1186** (1994) 52.

# 6．水素発生

増川　　一[1,2)]

光合成生物による水素発生は，酵素ニトロゲナーゼまたはヒドロゲナーゼにより触媒される．本稿ではガスクロマトグラフィーを使用した水素発生の分析方法について述べる．

## Measurement of photobiological hydrogen production

Hajime Masukawa

Many microorganisms, eukaryotic as well as prokaryotic, can evolve $H_2$. The enzymes of $H_2$ production are either hydrogenase or nitrogenase, both of which are generally sensitive to $O_2$. Here, method for measurement of $H_2$ production by photosynthetic microorganisms using gas chromatography has been described.

### 6.1　水素を発生する生物とその酵素

水素を発生する光合成生物には，水を電子供与体として酸素発生型光合成をするシアノバクテリアや緑藻，硫化水素などの硫黄化合物や有機物を電子供与体とする各種光合成細菌がある[1)]．光合成生物以外にも，有機物や糖類を電子供与体として暗所嫌気性発酵過程により水素を発生する発酵細菌などがあるが本稿ではふれない．

水素発生を触媒する酵素は，ニトロゲナーゼ（nitrogenase）またはヒドロゲナーゼ（hydrogenase）であり[1,2)]，どちらも一般的に酸素感受性が高く，酸素共存下では失活しやすい．一般的に，光合成細菌による水素生産は，嫌気的条件を必要とする．酸素発生型光合成生物である緑藻やシアノバクテリアのヒドロゲナーゼを利用した生産系では，水素生産系に嫌気的（微好気的）条件を必要とする．シアノバクテリアのニトロゲナーゼを利用した生産系では，好気的条件下でも水素発生を持続できる．発生または吸収された水素は，ガスクロマトグラフィー，水素電極，ガス質量分析法などにより定量される．ガスクロマトグラフィーは，多数のガスサンプルを短時間で簡便に分析するのに適しているので，この方法について紹介する．

### 6.2　ニトロゲナーゼによる水素発生

#### 6.2.1　ニトロゲナーゼ反応と水素代謝

ニトロゲナーゼは，生理的には窒素固定酵素として働き，シアノバクテリア，光合成細菌などのさまざまな原核生物に分布するが，緑藻などの真核生物には見られない．窒素化合物（硝酸，アンモニア，尿素など）を含む培地（＋N 培地）からそれらを取り除いた培地（－N 培地）に細胞を移し培養すると，細胞内が窒素飢餓状態になり，ニトロゲナーゼの遺伝子発現が誘導される．

ニトロゲナーゼ反応の必然的副産物として水素が発生し，反応式は，窒素ガス存在下では次式のように表される：

$$N_2+8e^-+8H^++16ATP\rightarrow H_2+2NH_3+16(ADP+Pi) \quad (1)$$

窒素ガスが存在しない条件下（例：Ar 気相）では，全ての電子が水素発生に向かう：

$$2e^-+2H^++4ATP\rightarrow H_2+4(ADP+Pi) \quad (2)$$

この反応は不可逆的に水素発生に向かうので，ヒドロゲナーゼと異なり（後述），酸素共存下でも逆反応の水素吸収が起こらない．しかし，多くの窒素固定生物は，水素の吸収に働く取り込み型ヒドロゲナーゼ（uptake hydrogenase，通称 Hup）を持ち，酸素共存下では，ニトロゲナーゼ反応により発生した水素は Hup により再吸収され，エネルギー源として再利用される．このため，取り込み型 Hup 活性を持つ株では，実際に測定される正味の水素発生速度は低くなる．なお，単細胞性の窒素固定シアノバクテリア野生株のごく一部には，取り込み型 Hup の遺伝子または活性が見られず，ニトロゲナーゼによる比較的高い水素発生速度を示すものもいる[3,4)]．取り込み型 Hup を持つものでも，その遺伝子破壊によって水素再吸収が抑えられるので，野生株と比べて高い水素発生速度を示すことが，これまでに光合成細菌やヘテロシ

1）ミシガン州立大学
2）神奈川大学光合成水素生産研究所

スト形成するシアノバクテリアで示されている[5-8]．

### 6.2.2　各種光合成生物のニトロゲナーゼによる水素発生

光合成細菌のニトロゲナーゼによる水素発生では，ニトロゲナーゼばかりでなく細菌の生育自体も酸素感受性であるため，嫌気条件でなければ持続しない．一方，シアノバクテリアの中には，酸素発生型光合成とニトロゲナーゼ反応とを空間的，または時間的に分離することによって，酸素感受性ニトロゲナーゼが失活することを防ぎ，これらの反応を両立させているものがいる[2,7]．このようなシアノバクテリア株では，ニトロゲナーゼ誘導のための培養を好気的条件下（空気中）で行うことができる．特に，ヘテロシスト形成する株（後述）は培養などの取り扱いが容易なため，水素発生の研究材料としてよく用いられている．

空間的分離は，糸状性シアノバクテリアの中の *Anabaena*, *Nostoc* 属等で見られ，窒素栄養欠乏下で通常の酸素発生型光合成を行う栄養細胞の一部が約 10-20 細胞間隔でヘテロシストと呼ばれる異型細胞へ分化し，そこでニトロゲナーゼ反応を行う．ヘテロシストは窒素固定に特化しており，自身は光化学系 I のみを持ち，酸素発生に係わる光化学系 II を持たないので酸素発生型光合成を行わず，さらに呼吸活性を上昇させるなどにより内部の細胞内酸素濃度を低く保つことにより，ニトロゲナーゼを酸素失活から保護している．ニトロゲナーゼ反応には，多量の電子と ATP が必要であるが，前者は栄養細胞から供給される有機化合物（通常の酸素発生型光合成により合成）に依存し，後者は異型細胞内の光化学系 I 周辺の電子伝達に共役した光リン酸化および呼吸によって供給される．ヘテロシストは，一般的に，＋N 培地から－N 培地へ移行して約 1 日後に形態学的分化が完了し，ニトロゲナーゼの発現は，ヘテロシスト形成以降（－N 培地移行後，約 1 日目以降）に誘導されてくる．

時間的分離は，窒素固定を行う単細胞性（*Cyanothece*, *Gloeothece* 属等）や一部の糸状性シアノバクテリア（*Oscillatoria*（新名：*Plantothrix*），*Trichodesmium* 属等）で見られ，ニトロゲナーゼによる水素発生は一般に細胞の概日周期により制御されていると考えられる．この場合，同一細胞が日中（明期）は酸素発生型光合成により $CO_2$ から有機化合物を合成し，夜間（暗期）は，日中（明期）に合成した有機化合物を利用して呼吸活性を上昇させることにより細胞内酸素濃度を低下させると同時に ATP を生成し，ニトロゲナーゼ反応を行う．ニトロゲナーゼは，暗期に入って数時間後に誘導されてくる．一部のものは，日中もニトロゲナーゼ活性を示すが，これは細胞の一部が異型細胞を形成することなく酸素発生型光合成活性を一時的に失い，ヘテロシスト内と同様な代謝経路により窒素固定を行うと考えられる．

### 6.2.3　ニトロゲナーゼによる水素発生の分析法

#### 6.2.3.1　ニトロゲナーゼ活性の誘導

ニトロゲナーゼは，細胞を＋N 培地から－N 培地に移して培養を続けると誘導される．誘導にかかる時間は生物種や株で異なる．時間的分離により窒素固定するシアノバクテリアでは，－N 培地で暗期に入って数時間後に誘導されてくるが，ヘテロシスト形成するシアノバクテリアでは，ヘテロシスト形成以降（－N 培地移行後，約 1 日目以降）に誘導されてくる．ニトロゲナーゼの活性と Ar 気相下で測定した水素発生速度は，ほぼ比例し，それらの活性は－N 培地移行後，対数増殖期に最大になり，それ以降急激に低下していく傾向がある．活性が最大となるタイミングも株や培養条件により数時間から数日異なる．このため，カルチャーの時期によって，水素生産速度は大きく異なることがある．

#### 6.2.3.2　水素発生時の気相条件

酸素共存下では，取り込み型 Hup による水素吸収が原因となり，正味の水素発生速度は低くなり，場合によっては，ニトロゲナーゼの活性はあるが水素発生は検出されないこともある．気相を Ar（アルゴン）ガスに置換することにより，ニトロゲナーゼを経由する電子はすべてが水素生産に振り向けられ（反応式 2），酸素濃度が低いので取り込み型 Hup による水素吸収活性が抑えられる．Ar 気相下（数%程度の $CO_2$ を含む）での水素発生は，シアノバクテリア *Anabaena*，*Nostoc* 属の Hup 遺伝子破壊株を用いた実験では，光合成により発生する酸素の共存下で約 1 週間程度は持続させることができるが，窒素栄養が不足して細胞が弱っていくためか，水素発生速度は次第に低下していく傾向がみられる[5]．

#### 6.2.3.3　ガスクロマトグラフィー

検出器に TCD（thermal conductivity detector）を備えたガスクロマトグラフィー（ガスクロ）を用いる．ガスクロには，キャピラリカラム用とパックドカラム用があり，前者の分離能力は非常に優れているが，後者でも水素の分析を十分に行える．ガスクロに装着するガス分離カラムは，molecular sieve 5 A または molecular sieve 13 X を使用する（水素の分離に必要な時間は，molecular sieve 13 X の方が短い）．水素のみの検出を目的とする場合，キャリアーガスに窒素（$N_2$）ガスを用いる．また，水素，酸素，窒素ガスを分離する場合，分離カラムに molecular sieve 5 A，キャリアーガスに Ar ガスを用いる．より純度の高いガスをキャリアーガスとし

て用いることで，検出感度を向上させることができる．キャピラリカラム用のガスクロ装置で，molecular sieve 5 A カラム，キャリアーガスに Ar ガスを用いて，水素，酸素，窒素ガスを分離した分析例を図 1 に示す．

#### 6.2.3.4 実験方法

ここでは，嫌気操作の必要がなく，取り扱いが容易なヘテロシスト形成するシアノバクテリアを用いた水素発生の分析手順を紹介する[5–7]．

1．ニトロゲナーゼを誘導するため，＋N 培地（BG11 または AA/8（＋N））で培養したカルチャーから細胞を遠心で集め，－N 培地（$BG11_0$ または AA/8）で 1–2 回洗った後，細胞を新しい－N 培地に移す．その際，－N 培地中の細胞密度が高くなりすぎないようにする（細胞密度が高い光制限下では，ニトロゲナーゼが十分に誘導されないことがある）．

2．－N 培地中でのニトロゲナーゼ誘導に必要な時間は，株や培養条件により異なる．十分に誘導されていないカルチャーでは，水素発生が検出されないこともあるので，－N 培地に移して 1 日目，または必要に応じて 2 日目以降のカルチャーの一部を遠心で濃縮し，適当な濃度に調整する（*Anabaena*，*Nostoc* 株では，濃度 5 $\mu$g Chl/ml 前後）．

3．濃縮した細胞懸濁液を透明なガスクロサンプリング用バイアル（容量約 7–10 ml 前後）に 1–2 ml 入れ，ゴム栓（ブチルゴムまたは PTFE/Silicone 栓）をし，上部に穴のあいたスクリューキャップを閉める．ガスクロバイアルは，日電理化硝子や Sigma-Aldrich/Supelco などから購入できる．ブチルゴムまたは PTFE/Silicone のゴム栓は，耐久性，機密性に優れ，何回か針を刺してもガスが漏れることなく使用できる．

4．ガスクロバイアルのゴム栓に 2 本針を刺し，一方の針から Ar ガスを入れ，もう一方を出口として，バイアル内の気相に Ar ガスを通し（Ar ガスの流速にもよるが 5–10 分程度），気相を Ar に置換する（図 2）．

5．光照射下で，バイアル内の細胞懸濁液が十分懸濁されるように振とうさせながら，1 時間前後プレインキュベーションする．

6．再度，Ar ガスを通して（操作 4），光照射下に置き，1–2 時間インキュベーションする．1–2 時間程度のインキュベーションであれば，$CO_2$ は必ずしも必要ないが，数時間～数日間にわたる場合，水素発生を持続させるために，ガスタイトシリンジを用いて $CO_2$ を加える必要がある．暗所で水素発生する生物の場合は，操作 5，6 を暗所で行う．

7．バイアル内の気相からガスタイトシリンジで 0.5–1 ml（パックドカラム使用の場合）のガスサンプルを取

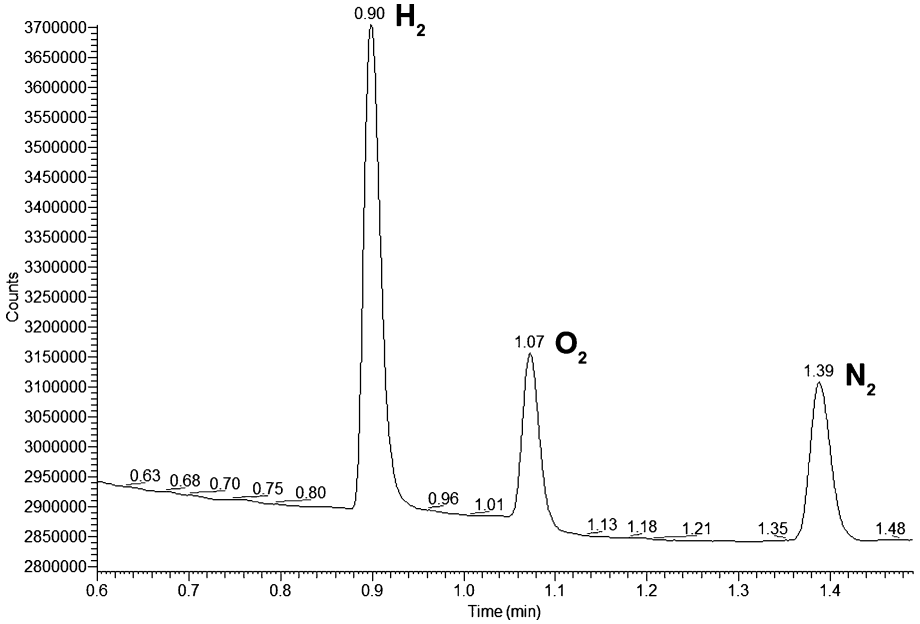



**図 1**：キャピラリカラム用ガスクロマトグラフィーによる水素，酸素，窒素ガスの分離
水素のピークは 9.4 nmol，ガスサンプル中の水素濃度は約 0.12%(v/v)に相当する．インキュベーション前に Ar ガスを約 10 分間通した場合でも，微量の酸素，窒素ガス（濃度 1％(v/v) 以下）が検出される．これは，(1)光合成により酸素が発生する，(2)微量の空気が Ar 置換時やガスタイトシリンジを用いたサンプリング時に残留・混入するためと考えられる．
ガスクロ装置本体：Trace GC Ultra (Thermo Scientific), Column: molecular sieve 5 A (Restec, 30m, 0.53mm ID), Sample size: 0.2 mL, Column temp.: 70°C, Carrier gas: Argon 10 ml/min, Detector: TCD.




図2：気相のAr置換

り，TCDを装備したガスクロに注入する（キャピラリカラム使用の場合，注入量はこれよりも少量でよい（図1参照））．

8．ガスサンプル分析の前後に，濃度調整された標準水素ガスを用いて校正し，検出した水素量を計算する（自動的に計算されるように機器設定する）．純水素ガスから適当な濃度の標準水素ガスを作成する場合，$O_2$を含んだガスと混ぜると，一部が$O_2$と反応して水になるおそれがあるので，必ずArまたは$N_2$ガスを満たした容器内に純水素ガスを加えて希釈する．しかし，低濃度の正確な標準ガスが必要な場合には，ボンベ入りの標準ガスをメーカー（GL Sciencesなど）から購入し使用する．

## 6.3　ヒドロゲナーゼによる水素発生

一部の酸素発生型光合成生物（シアノバクテリア，緑藻）は，光照射下でヒドロゲナーゼによる水素発生を行うことがあるが，これは生理学的には，過剰な電子を水素として排出することにより細胞内が過度に還元的になるのを防ぐという意義があると考えられる．

$$2e^- + 2H^+ \leftrightarrow H_2 \qquad (3)$$

この反応は，シアノバクテリアでは双方向性ヒドロゲナーゼ（bidirectional hydrogenase，通称Hox）が，緑藻ではFe型ヒドロゲナーゼ（可逆性ヒドロゲナーゼ（reversible hydrogenase）とも呼ばれる）が触媒する．シアノバクテリアのヒドロゲナーゼ（双方向性Hoxおよび取り込み型Hup）は，活性中心部位に鉄（Fe）とニッケル（Ni）を結合したNiFe型に属し，双方向性Hoxの電子供与／受容体は$NAD(P)H/NAD(P)^+$である．緑藻のFe型ヒドロゲナーゼの活性中心はFeを含むがNiを含まないFe型で，電子供与体はフェレドキシンである．Fe型ヒドロゲナーゼは，嫌気性細菌や古細菌にも分布するが，シアノバクテリアには見られない．Fe型ヒドロゲナーゼは，双方向性Hoxと比べて，代謝回転の速度が高く，電子供与体となるフェレドキシンはNADPHよりも酸化還元電位が低いので，水素生産にとって好都合だと考えられる．

ヒドロゲナーゼ反応（反応式3）は可逆的であるため，光照射，酸素共存下で細胞内が酸化的になると，逆反応により水素を吸収する，または，ヒドロゲナーゼ活性が酸素により失活してしまうため，水素発生が短時間しか起こらない．一つの方法として，通常の光合成により有機物を十分蓄積させた後，暗所嫌気条件下に移し，ヒドロゲナーゼによる水素発生を発酵過程により起こすことができる[10]．また，緑藻*Chlamydomonas*では，通常の光合成による有機物の蓄積後，生育培地を硫黄欠乏培地に変えることにより，光照射，嫌気下で水素発生が起こる[11]．このメカニズムは，硫黄欠乏下で光化学系II活性が次第に低下していき，蓄積している有機物が主な電子供与体となって光化学系I，フェレドキシン，ヒドロゲナーゼによる水素発生が起こり，光化学系IIより発生するわずかな酸素は有機物を消費する呼吸により消去されると考えられる．

上記のようなヒドロゲナーゼによる水素発生には，嫌気的条件が必要である．発生した水素は，ニトロゲナーゼの場合と同様に，一定時間蓄積させた後，ガスサンプルをガスタイトシリンジでとり，ガスクロで分析する．また，$N_2$やArなどのガスを低速で流し（lifting gas），ガス中の水素を分取または連続的に測定するという方法もある．

生理的条件下で水素発生が見られない場合でも，細胞懸濁液または細胞抽出物に嫌気下（Arまたは$N_2$ガス気相下）でsodium dithionite（$Na_2S_2O_4$）（最終濃度20 mM），methyl viologen（最終濃度2 mM）を加えた還元的条件で，ヒドロゲナーゼによる水素発生が起こる．この方法で，双方向性またはFe型（可逆性）ヒドロゲナーゼ活性を簡便に測定することができる[12]．

## 参考文献


1）K. K. Rao & R. Cammack, Hydrogen as a Fuel ── Learning from Nature, ed. R. Cammack, M. Frey, R. Robson, Taylor & Francis, 2001, p.201.

2）P. Tamagnini, R. Axelsson, P. Lindberg, F. Oxelfelt, R. Wunschiers, & P. Lindblad, Microbiol. Mol. Biol. Rev. **66** (2002) P.1.

3）S. Kumazawa & A. Mitsui, Biotechnol. Bioengineer. **44** (1994) P.854.

4）S. Kumazawa & H. Asakawa, Biotechnol. Bioengineer. **46** (1995) P.396.

5）T. Happe, K. Schütz, & H. Böhme, J. Bacteriol. **182** (2000) P.1624.

6）H. Masukawa, M. Mochimaru, & H. Sakurai, Appl. Microbiol. Biotechnol. **58** (2002) P.618.

7）H. Sakurai & H. Masukawa, Mar. Biotechnol. **9** (2007) P.128.

8）F. Yoshino, H. Ikeda, H. Masukawa, & H. Sakurai, Mar. Biotechnol. **9** (2007) P.101.

9）H. Masukawa, K. Inoue, & H. Sakurai, Appl. Environ. Microbiol. **73** (2007) P.7562.

10）P. C. Hallenbeck & J. R. Benemann, Int. J. Hydrogen Energy **27** (2002) P.1185.

11）A. Melis & T. Happe, Photosyn. Res. **80** (2004) P.401.

12）P. Tamagnini, O. Troshina, F. Oxelfelt, R. Salema, & P. Lindblad, Appl. Environ. Microbiol. **63** (1997) P.1801.

# 7．膜電位の測定

伊藤　　繁[1)]

光合成光反応は電子の動き（酸化還元反応に伴う電流）を膜内に作りだし，光合成膜系で仕切られた内外溶液相間に電位差(膜電位，$\Delta\varphi$)を生じる．これとは別に，酸化還元反応に伴う水素イオン($H^+$)の膜内外での消失と出現，膜を横切る動きが，内外溶液相間に $H^+$ 濃度差($\Delta$pH)を作り出す．$\Delta\varphi$ と $\Delta$pH で変わる $H^+$ を動かす力(エネルギー差)は，$H^+$ についての液相間での電気化学ポテンシャル差($\Delta\bar{\mu}_{H^+}=\Delta\varphi-(RT/F)\cdot\Delta pH$)で表される．ATP 合成酵素は $\Delta\bar{\mu}_{H^+}$ を消費して $H^+$ を動かし，分子を回転させ ATP 合成をする．ここでは 1．膜電位と $\Delta\bar{\mu}_{H^+}$ の発生と測定の原理，2，$\Delta\bar{\mu}_{H^+}$ の解消と脱共役，3．実際の測定例を解説する．

## Measurement of membrane potential

Principles of formation of membrane potential in photosynthesis are reviewed. Photosynthetic electron transfer reaction forms the electrochemical potential difference of electrons, protons and ions across the membranes. Simple equations to understand the ion and electron movements in relation to membrane potential and membrane surface potential are shown. Methods for the measurements of membrane potential by using the carotenoid electrochemical bandshift and the ion distributions are interpreted with examples.

## 7.1　膜電位

### 7.1.1　膜電位と $\Delta\bar{\mu}_{H^+}$ の発生と測定の原理

(1) なぜ細胞や葉緑体膜は閉じた袋状なのか？「化学浸透圧説の誕生」

光合成では光により電子やイオンが動く．電子の動きは，水を酸化したり，キノンや $NADP^+$ の還元をおこすが，これと同時に電流として電位差（電圧差）を作り出す．この溶液相間の電位差を膜電位 $\Delta\varphi$ と呼ぶ．図 1 は，植物葉緑体やシアノバクテリア膜系内部での光合成電子移動経路を模式的に示す．光化学系 I と II 反応中心複合体内では，電子は内側から外側に向かって膜内を移動し，シトクロム $b_6/f$ 複合体内でも電子は外側に向かって動く．全体としてみると電子の流れは絶えず外側に向かい，内側が正，外側が負の電位差 $\Delta\varphi$ を生じる．これを electrogenic（電位差発生的）な電子の動きと呼ぶ．一方膜内での，プラストキノン酸化型（PQ）と，水素イオン（$H^+$）を結合した還元型の（$PQH_2$）の動きは電荷移動を伴わないので，$\Delta\varphi$ を変えない．光化学系 II での PQ の光還元反応，シトクロム $b\,6/f$ 複合体内での酸化還元反応，光化学系 I での $NADP^+$ の還元反応では膜内側への $H^+$ 放出，膜外側での $H^+$ 結合により，酸化還元反応全体として電位が正にある膜内側に向かって，エネルギーに逆らって（能動輸送と呼ぶ），$H^+$ が運ばれる．

どうしてこのような方向で電子が移動するのだろうか？　まだ膜タンパク質の位置や構造が不明な時代に，P. Mitchell (1966[1)]，1968[2)]) は，「生体膜上の蛋白質は一定向きに配列され，光合成や呼吸電子伝達系は膜を横切り一方向のみに電子を動かし $\Delta\varphi$ を増大させ，さらに $H^+$ を動かす．同じ膜上に並んだ ATP 合成酵素は，これと反対向きに水素イオンを動かし ATP を合成する」という「化学浸透圧説（chemiosmotic theory)」を提案した．この時期に急発展した生化学は，タンパク質一つ一つを精製し，分子レベルで調べることを目標としていた．蛋白質複合体を精製し，溶液中で混じり物のない状態での研究が可能になりつつあった．このような状況で「閉じた袋状の膜構造そのものに意味が有る」というこの提案は，大物生化学者たちとの間に，大論争を巻き起こした．私自身も英国での postdoc 時代に「Mitchell は気が狂っている」という反対意見をよくきいた．シンポジウムや学会ごとに会場挙げての熱い論争が 10 年以上つづき，これが光合成や呼吸などのエネルギー共役機構，膜構造，イオンや代謝産物の輸送，細胞膜の役割などについて，大きな研究発展をもたらした．この論争は，その後の生化学研究，特に光合成反応中心膜タンパク質の構造解析により，決着をつけられ，「化学浸透圧説」は生命現象の基礎概念の一つとして受け入れられた．

1）名古屋大学　大学院理学研究科物質理学専攻物理　光生体エネルギー研究室

(2) 膜電位の発生と測定の原理：

化学浸透圧説は，閉じた袋状のエネルギー変換膜の内外溶液相間での $H^+$ の動きがエネルギーを伝達する実体であると提案し，実証された．溶液中のイオンは，濃度の低い方向への拡散力（濃度差に依存）と，その電荷に働く電気的な力（電位差とイオン電荷に依存するクーロン相互作用）を受けて動く．従って，あるイオン種のモル自由エネルギー（電気化学ポテンシャル，$\bar{\mu}_i$）を，その活量（$a_i$，ほぼ濃度に等しい）と価数（$z_i$）とその場所の電位（$\varphi$）で表すことができる．

$$\bar{\mu}_i = \bar{\mu}_i^0 + RT\log a_i + z_i F\varphi \qquad (1)$$

$\mu_i^0$ は一定の標準状態（$\varphi=0$，$a_i=1$）での $\bar{\mu}_i$ の値，$R$ はガス定数，$F$ はファラデー定数，$T$ は絶対温度，log は自然対数である．イオンは $\bar{\mu}_i$ の差（エネルギー差）があると $\Delta\bar{\mu}_i$ のより小さい方へ移動させようとする力を受け，その動きで $\Delta\bar{\mu}_i$ 分の仕事がなされる．たとえば，葉緑体チラコイド膜の外液（o）と内液（i）間での pH 差が $\Delta pH_{(i-o)}$，電位差が $\Delta\varphi_{(i-o)}$ の場合，$H^+$ にかかわる電気化学ポテンシャル差は，

$$\begin{aligned}\Delta\bar{\mu}_{H^+} &= \bar{\mu}_{H(i)} - \bar{\mu}_{H^+(o)} \\ &= -2.3\,RT\Delta pH_{(i-o)} + F\Delta\varphi_{(i-o)}\end{aligned} \qquad (2)$$

で表される．$H^+$ の動きで $\Delta\bar{\mu}_{H^+}$ に応じたエネルギーが得られる，あるいは $H^+$ を動かすには $\Delta\bar{\mu}_{H^+}$ 分のエネルギーを要する．この式から，同量の $H^+$ が動いても，得られるエネルギーは ΔpH，$\Delta\varphi$ に依存して変わることがわかる．室温 300 K では $2.3\,RT/F = 60$ mV なので，1 ΔpH は約 60 mV の $\Delta\varphi$ に相当する．$\Delta\varphi$ の変化は水素イオン以外の全イオンの動きにも同時に影響する．今，イオン X の平衡を考えると，

$$\begin{aligned}\Delta\bar{\mu}_X &= \bar{\mu}_{X(i)} - \bar{\mu}_{X(o)} \\ &= 2.3\,RT\cdot\log(C_{(i)}/C_{(o)}) + z_i F\Delta\varphi_{(i-o)}\end{aligned} \qquad (3)$$

C はイオン濃度．電気泳動でよく見られるように，$\Delta\varphi$ に従ってイオンは動く．逆にイオンの分布と $\Delta\bar{\mu}_X$ がわかれば $\Delta\varphi$ を算出できる．もう一つ大事な事は，膜透過性のないイオンにはこれは関係ない（膜透過性に依存する）．従って，チャンネルタンパク質や後述のイオノホアなどで特定イオンの膜透過性を変えると，電子移動や他イオンの動きできまる $\Delta\varphi$ に応じてそのイオンが動き，これがまた $\Delta\varphi$ や $\Delta\bar{\mu}_X$ を変える．生体膜は $\Delta\bar{\mu}_{H^+}$ の積極的な形成（電子移動やイオンの能動輸送）と，イオン種ごとの透過性の違い，イオン間の共役関係をうまく制御して ATP 合成やイオン輸送を行い，細胞内環境や代謝産物の移動をうまく制御している．$\Delta\bar{\mu}_X$ に従うイオンの動きを受動輸送，逆らう輸送を能動輸送という．

逆に膜を横切る物質の動きはエネルギーの変化をともなう．この関係を利用してエネルギー共役（たとえば，電子伝達反応と ATP 合成反応間でのエネルギーの交換）が行われる．電子伝達系は電子を膜中で動かし，$\Delta\varphi$ をつくり，同時に膜外と中での $H^+$ 量をかえる．$\Delta\bar{\mu}_{H^+}$ を

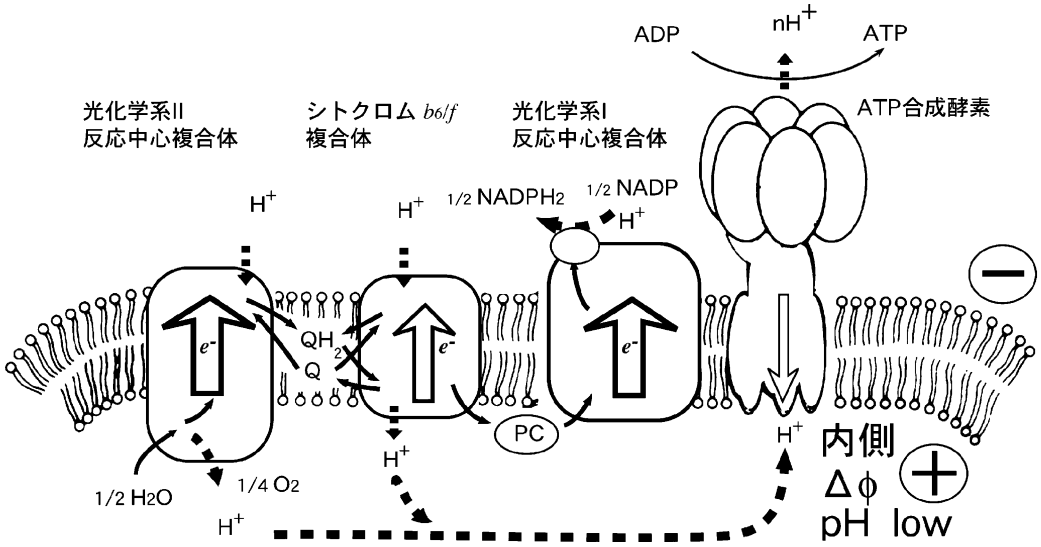



**図1**：葉緑体チラコイド膜上の電子伝達系と ATP 合成酵素の働きによる $\Delta\bar{\mu}_{H^+}$，$\Delta\varphi$，ΔpH の生成と解消．光化学系 I と II 反応中心複合体内とシトクロム $b_6f$ 複合体中での膜外向きの電子の動き（白矢印）が内側が正の向きに $\Delta\varphi$ を形成する．電子伝達反応に伴い $H^+$ は膜外側で吸着され，内側で放出される．こうして作られた $\Delta\bar{\mu}_{H^+}$ が ATP 合成酵素で $H^+$ を膜外側へ動かし，ATP 合成を駆動する．$H^+$ の電荷は電子と違い正なので，外向きに動くと $\Delta\varphi$ は減少し（ATP 合成酵素内部の細い白矢印），同時に ΔpH も減少する．

利用したATP合成酵素によるATP合成では以下の式が実現されると期待される．

$$n\Delta\bar{\mu}_{H^+}=\Delta G_p^0+2.3\,RT\log(ATP)/(ADP)(Pi)\quad(4)$$

$n$は1ATP合成に必要な$H^+$の個数，$\Delta G_p^0$はATP合成に伴う標準Gibbs自由エネルギー変化で約32 kJ/molである（pHに依存する）．右辺の値は通常のpHや実験条件下で200–600 mVに相当する．たとえば$\Delta\varphi=0$，$\Delta pH=2-3$なら$1/F\cdot\Delta\bar{\mu}_{H^+}$は180 mVとなりn＝2か3で(4)式が成立する．最適実験条件下では2 $H^+$でATPが合成される．

化学浸透圧説は電子伝達系と葉緑体やミトコンドリアのATP合成のエネルギー共役機構を示しただけでなく，細胞膜を始め様々な生体膜系でのイオンや分子の輸送現象についての理解を進めた．最近では，分子構造の解明や1分子観察法により，ATP合成酵素の膜外側部位（$F_1$部位）の回転にともなうATP合成が示されている．たった2名のGlynn Research Laboratory（ロンドン大学に今でも記念研究室がある）の小さな研究室でP. Mitchellが主張し，戦った新しい考え方が生命理解の基本概念の一つとなった．

(3) 電子伝達系による$\Delta\varphi$と$\Delta\bar{\mu}_{H^+}$の形成

葉緑体チラコイド膜では，図1に示すように膜の内側から外側に電子が動き，膜胞内側が正の電位差（膜電位$\Delta\varphi$）が生じる．内側正の$\Delta\varphi$に逆らってより$\Delta\bar{\mu}_{H^+}$を高める方向に$H^+$が運ばれる．膜を横切る電子やイオンの移動は$\Delta\varphi$を変える．一方，膜表面での$H^+$の放出や吸着などは$\Delta\phi$を変えず，ΔpHのみに影響する．ΔpHと$\Delta\varphi$に応じて$\Delta\bar{\mu}_{H^+}$が変わる．膜横方向での電子や$H^+$の移動は同じ溶液相内での別のイオンの動きでうち消されるので$\Delta\varphi$，ΔpHを変えない．膜で隔てられた溶液相間では，膜を横切る電子やイオンの動き（電流）がない限り$\Delta\varphi$は変化しない．

### 7.1.2 $\Delta\bar{\mu}_{H^+}$の解消と脱共役

(1) 様々な$\Delta\bar{\mu}_{H^+}$の解消過程

$\Delta\bar{\mu}_{H^+}$はATP合成や（図1）やイオン透過性を変える試薬の添加で変化する（図2）．それぞれの過程を以下に説明する．

1）ATP合成：$\Delta\varphi$やΔpHは，膜を通してイオンや$H^+$が動けば変わる．光で駆動される電子伝達反応と逆向きにATP合成で$H^+$が動けば，エネルギーが得られ，その分$\Delta\bar{\mu}_{H^+}$は減少する（図1）．

2）表面活性剤：膜に孔をあけたり，壊したりして$H^+$や他のイオンが自由に動けるようにすると，ATPを合成しなくても$\Delta\varphi$は減少する．たとえば，表面活性剤トリトンX-100を膜構造を大きくこわさないような低濃度（0.01%）加えるだけでも，膜のイオン透過性は高まり，$\Delta\varphi$とΔpHは消失する．ATP合成も阻害される．

3）イオノホア：イオンの膜透過性を選択的に変える様々な分子が知られている（図2）．これらの組み合わせで，ATP合成と$\Delta\bar{\mu}_{H^+}$の関係が確認された．

細菌を殺す抗生物質として発見されたバリノマイシンは$K^+$と膜透過性の高い包摂化合物をつくる．$K^+$－バリノマイシンの高い膜透過性により$K^+$の動きが促進され，($K^+$濃度差が大きくなければ)$\Delta\varphi$のみが消失する．従って，バリノマイシン添加のみではATP合成は阻害されない．逆に膜内外液相間に$K^+$濃度差を作っておき，バリノマイシンを加えると濃度差に応じた$\Delta\varphi$（拡散電位：式3で$\Delta\bar{\mu}_X=0$に相当）が一時的に形成される．$K^+$移動により濃度差が解消するとともにこの$\Delta\varphi$は消える．

グラミシジンは膜に穴を開け，$H^+$，$Na^+$，$K^+$，$Rb^+$などの透過性を増大し，$\Delta\varphi$を消失させる．この場合にはΔpHも消失するのでATP合成が阻害される．

ナイジェリシンは$H^+$との結合型と$K^+$との結合型が共に電荷なしに膜を透過するので$H^+$と$K^+$の交換を早める．この交換は$\Delta\varphi$の変化をもたらさない．従って$K^+$存在下で$\Delta\varphi$は消さずにΔpHだけを消す．ATP合成は阻害しない．

農薬でもあるCCCP（carbonylcyanide *m*-chloromethoxyphenylhydrazone）は$H^+$結合型（中性），非結合型（負イオン）ともに高い膜透過性をもち$H^+$透過性を高める．負イオン型の動きは$\Delta\varphi$を$H^+$結合型の動きはΔpHを消し，$\Delta\bar{\mu}_{H^+}$を消失させる．従ってATP合成を強く阻害する．

4）膜透過性のアミン類：中性では膜透過性が高く，$H^+$を結合し荷電型になると膜を透過できないようなアミン類（アンモニアやアルキルアミン）は，ΔpHが形成され膜内側の$H^+$濃度が高くなると膜内側溶液中に蓄積し，結果としてΔpHだけを消す．低濃度のアミンはATP合成をとめないが，高濃度加えるとΔpHの寄与が大きい葉緑体などではATP合成をかなり抑制する．また，ΔpHにあまり影響しない低濃度(数$\mu$M程度）で分布を測定できる蛍光性や放射性アミンの膜内外での分布差から，ΔpHを測定できる(9-アミノアクリジンや，同位体置換したメチルアミンなど：表1)．

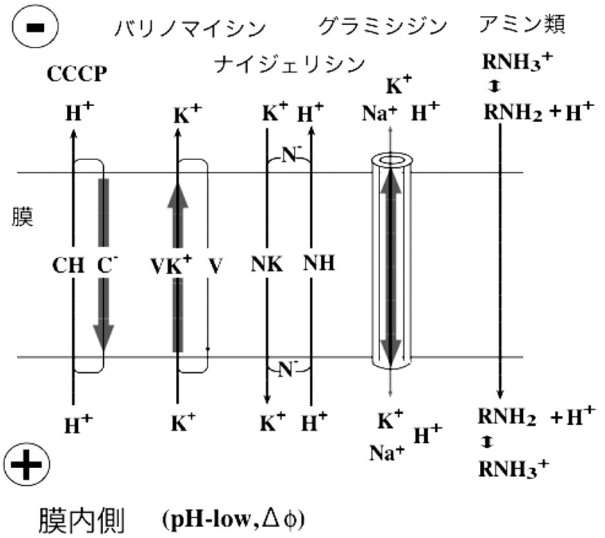



**図2**：イオノホアとアミン類による膜透過性と，ΔpH，$\Delta\varphi$ の変化の模式図

(2) 脱共役と電子伝達速度

1）脱共役：電子伝達反応は $\Delta\varphi$ や ΔpH を作り出す．では $\Delta\varphi$ や ΔpH が変わると，電子伝達速度はどうなるだろうか？

$\Delta\varphi$ に応じて，膜内成分の酸化還元電位は実質的に変化する．たとえば，酸化還元滴定では，外部溶液中に加えたメデエーターの酸化還元状態を溶液中の電極等により電位としてモニターし，それと平衡な膜内電子伝達成分の酸化還元状態をみる．しかし電極面と違う電位 $\Delta\varphi$ にある膜内側の成分に電子を渡すためには，$-\Delta\varphi$ の寄与分だけ余分に仕事が必要なので，見かけの酸化還元電位の値も $\Delta\varphi$ だけずれる．これは，膜内側に正の $\Delta\varphi$ がかかっていれば，負電荷をもつ電子はより多く存在できる（平衡下では，式3で $\Delta\bar{\mu}_{e^-}=0$ であるから，$\Delta\varphi$ 分だけ log($e^-$)が変わるはずである）として定性的にも理解できる．ある成分についての電子の濃度（＝酸化還元状態）が変われば反応速度も変わる．従って，$\Delta\varphi$ に応じて，電子伝達速度は変化する．また膜内 pH の変化も $H^+$ 濃度を変えて反応速度を制御する．定常光照射下でできる $\Delta\bar{\mu}_{H^+}$ が光反応で生み出される自由エネルギー変化と釣り合えば，そこで電子伝達速度も遅くなり，後は $\Delta\bar{\mu}_{H^+}$ の減少分だけしか電子伝達が進まなくなる．ここで ATP 合成を促進して $\Delta\bar{\mu}_{H^+}$ を減少させれば電子伝達速度は再び早まる．同様に，イオノホアや表面活性剤添加などで $\Delta\bar{\mu}_{H^+}$ を下げると電子伝達は速くなり，ATP 合成もとまる．これを脱共役とよぶ．

2）膜表面電位：膜表面はタンパク質などの固定電荷により，溶液中に比べて通常 10–50 mV 負に帯電している．すなわち，式3を同じ溶液中とそれとつながる膜表面に当てはめると $\Delta\bar{\mu}_{H^+}$ ＝ゼロでも，表面での局所的な固定電荷の密度は違うので，電位，イオン濃度，$H^+$ 濃度は異なり，反応速度に影響を与える．この固定電荷による外液相と膜表面との電位差を「膜表面電位：$\Delta\psi$ とよぶ．固定電荷の影響は他のイオンがあれば遮蔽されるので，溶液の塩濃度の−1/2 乗に依存して変化する．低塩濃度では大きく（チラコイド膜では 10 mM NaCl 存在下で $\Delta\psi=-60$ mV 程度），高塩濃度ではより小さくなる．膜表面電位は膜電位と違い膜を隔ての(溶液相間の)$\Delta\bar{\mu}_{H^+}$ に影響せず，エネルギー共役に直接影響を与えない．しかし，膜表面での電子伝達速度には大きく影響する[6]．例えば，式 (3) から，

$$\Delta\bar{\mu}_{(\text{表面}-\text{外液中})} = 0 = 2.3RT\cdot\log(C_{(\text{表面})}/C_{(\text{外液中})}) + z_i F\Delta\psi_{(\text{表面}-\text{外液中})} \quad (5)$$

となり，-3 価のフェリシアナイドを pH 7 の反応液に 1 mM 加えると，10 mM NaCl 存在下で $\Delta\psi=-60$ mV の膜表面では，

$$C_{(\text{表面})}/C_{(\text{外液中})} = 10^{(-ziF\Delta\psi/2.3RT)} = 10^{-3}$$

となり，表面濃度は加えた濃度の 1/1000，すなわち 1 $\mu$M と計算される．NaCl 濃度を 100 mM に上げるか，1 mM の $MgCl_2$ の添加により全体で負に荷電した膜表面の固定電荷の影響を遮蔽してやると，$\Delta\psi=-20$ mV に下がる．すると $C_{(\text{表面})}$ は 10 倍あがる．当然，膜表面での反応速度も促進される．一方，電荷を持たない中性試薬の表面濃度は変わらず，正電荷を持つメ

**表1**：定常光下での，紅色細菌クロマトホア膜小胞での $\Delta\bar{\mu}_{H^+}$ 測定例，$\Delta\bar{\mu}_{H^+}$ は mV 単位で表示．括弧内は測定方法

| 試料 | ΔpH | $\Delta\varphi$（mV） | $\Delta\bar{\mu}_{H^+}$（mV） | 文献 |
|---|---|---|---|---|
| *Rb. sphaeroides* クロマトホア | −3〜−3.3 (9-アミノアクリジン蛍光法) | 200–240 mV (カロテノイド吸収帯シフト) | 350–440 mV | 7 |
| *Rs. rubrum* クロマトホア | −1.8 ($C^{14}$-メチルアミン分布) | 89 mV ($C^{14}-SCN^-$ 分布) | 200 mV | 8 |

チルビオローゲンなどの膜表面濃度は外液中より高くなっている．従って，生体膜上にある分子の見かけの酸化還元電位や，外部から加えたイオン性の分子との反応速度は膜表面電位に大きく影響される．酸化還元電位の決定や反応速度を測定するときには，塩濃度やpHの効果を確かめておくことが必要である．

### 7.1.3 膜電位の実測：カロテノイドシフトとイオンの分配

大きさが数十ミクロンある動植物細胞などでは膜内外溶液相に電極をいれ，膜電位を直接電位差として測定できる．しかし，チラコイド膜小胞や，光合成細菌の内膜(クロマトホア膜)などは数ミクロン以下であり，電極をいれるには小さすぎる．このため膜内部に結合しているカロテノイド色素や外部からいれた電位感受性試薬などの吸収変化や蛍光などを分光的に測定する．$\Delta\varphi$ に応答する事が知られている，チラコイド膜内タンパク質に結合したカロテノイド色素の吸収帯のシフトを利用した測定法を図3にしめす．タンパク質の膜内特定位置に結合したカロテノイドは極性の違いで有機溶媒溶液中と異なるスペクトルを示すだけでなく，各々の周囲アミノ酸残基が作る局所的外部電場強度の2乗に応じて吸収波長を変えている．さらに膜電位変化に伴う小さな電場変化 $\Delta\varphi$ がこれに加わると，ほぼ $\Delta\varphi$ に比例した吸収変化量を示す．同様な現象は紅色細菌膜のアンテナ色素タンパク質 $LH_2$ に結合したカロテノイドでも知られている．表1にはこれと，イオン分布測定法による $\Delta\varphi$ 測定結果を示す．

(1) 膜結合カロテノイドの吸光度変化（カロテノイドシフト）による $\Delta\varphi$ 測定[4),5)]

試料：反応液：3 mM リン酸カリウム緩衝液 pH 8.0，50 mM KCl，5 mM $MgCl_2$ にホウレンソウクラスII葉緑体（30 $\mu$g chl/ml）を懸濁する．新鮮なホウレンソウ葉を用い，1－2分くらいで手早く葉緑体を低温で単離し[5)]，測定する．時間とともに，膜系のイオン透過性が上がるので試料を調整し直す．発光時間10 $\mu$s の Xe 放電管（Sugawara MF-1500-U3）付きの閃光分光装置で518 nm でのカロテノイド吸光度変化を測定した．試料は1 x 1 x 5 cm の4面透明ガラスセルに2 ml いれた．閃光分光装置は散乱が多くても測定できるように，検出器と試料間が近いタイプがよい（2e参照）．励起閃光は色ガラスフィルター(650 nm 以上の光を通すカットオフフィルターを2枚）を通して試料にあて，強度を変えて吸収変化量がほぼ飽和していることを確かめておく．試料と検出器間には，閃光の漏出を防ぐため，518 nm に透過ピークをもつ干渉フィルターか青色ガラスフィルター(Corning 4-96)をいれ，信号／ノイズ比を高めるために，信号を加算平均した．

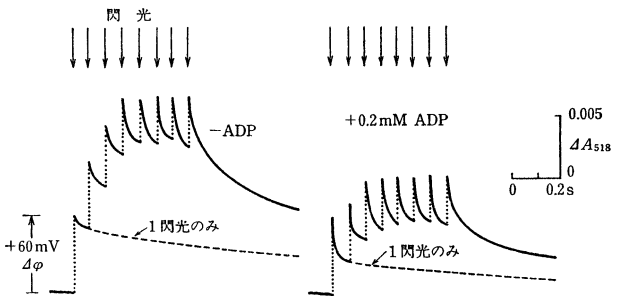



**図3**：518 nm でのカロテノイド吸収変化を利用した膜電位の測定．飽和光強度の10 $\mu$s の閃光を逐次8発当てた際の変化．下向き矢印は閃光照射の時間を示す．左右図はそれぞれATP の合成が抑制されている時と促進されている時を示す．1閃光で約 60 mV の膜の内側が正の $\Delta\phi$ が形成される．

解説：閃光照射により，電子が光化学系I，II反応中心内で膜内から外側にながれ，$\Delta\varphi$ が生じる．この $\Delta\varphi$ 値は，膜という平板コンデンサーに電荷を与えた際の電圧変化と同様に考えることが出来，電荷密度（光に応答する反応中心量）と電気容量（膜の厚さと膜の誘電率に依存）がわかれば電圧変化が計算できる．I，II反応中心の膜上での存在密度と膜の電気容量（約1 $\mu$F）から，約60 mV の膜内側正の $\Delta\varphi$ が1閃光照射後数ナノ秒で作られると計算できる[4)]．図1はキセノン放電管の閃光を繰り返し8発与えたときの吸光度変化をしめす．1閃光あたり 60 mV とすると，定常レベルではこの3倍の200 mV 程度の $\Delta\varphi$ が生じる．ADP を加えて ATP 合成を促進すると新たな速い $\Delta\varphi$ の減衰（半減期15ミリ秒）が見られた．$\Delta\varphi$ が ATP 合成で消費されることがわかる．

チラコイド膜では $\Delta\varphi$ 消失速度は比較的速く定常光照射下での $\Delta\varphi$ はあまり大きくならない一方，水の分解反応などで $\Delta pH = 3$ 以上（室温で 180-240 mV の $\Delta\bar{\mu}_{H^+}$ に相当する）が形成される．光照射下の定常状態での $\Delta\bar{\mu}_{H^+}$ は 300-400 mV と推定される．$\Delta\varphi$ の測定にはこの他に，電位感受性色素（メロシアニンなど）の吸収変化もよく使われる[6)]．

(2) 紅色光合成細菌の単離クロマトホア膜での，$\Delta\varphi$，$\Delta\bar{\mu}_{H^+}$ の測定例

カロテノイド吸収変化を示す紅色光合成細菌での実測例を示す（表1）．細胞膜とつながる光合成細菌のクロマトホア膜小胞系では $\Delta pH$ が小さく，$\Delta\varphi$ のほうが $\Delta\bar{\mu}_{H^+}$ への寄与が大きい．

イオン透過性の低いクロマトホア膜では，外部溶液内の $K^+$ 濃度を変え内外溶液相間にあらかじめ $K^+$ 濃度差をつくり，バリノマイシンを添加すると一時的に拡散電位による $\Delta\varphi$ を数分間安定に形成できる．この時の吸収変化量と比較することでカロテノイド吸収変化量と $\Delta\varphi$ 間の関係を得て，光照射時の $\Delta\varphi$ を算定する[7]．しかし，カロテノイドシフトを示さない紅色光合成細菌種も多い（例えば *Chromatium vinosum, Thermochromatium tepidum* など）．膜透過性のイオン（たとえば表1中の $C^{14}$–$SCN^-$）の膜内外での分配から $\Delta\varphi$ を算定することも行われている．

表1上段の実験では ΔpH は 9-アミノアクリジンの蛍光強度の減少として測定している[7]．このアミン色素は膜小胞内部に入ると $H^+$ を結合し正に荷電して，膜透過できず内部にたまる．内部の高濃度状態では蛍光強度が弱まる．この変化量から ΔpH に換算するには，同じような条件下で内外 pH を人為的に変えて作った状態での ΔpH に対する応答と比較するか膜小胞内部体積をみつもって計算する[7]．表1下段には放射性のアミン分子の分配から計算した ΔpH を示す[8]．使用する膜透過性イオン濃度が高いと ΔpH や $\Delta\varphi$ そのものが減るので，濃度を変えて測定するなどの注意が必要である．

## 引用文献


1）P. Mitchell (1966) Chemiosmotic coupling on oxidative and photosynthetic phosphorylation, Glynn Research, Bodmin.

2）P. Mitchell (1966) Chemiosmotic coupling and energy transduction, Glynn Research, Bodmin.

3）伊藤繁　光合成細菌（北村博，森田茂広，山下仁平編）膜電位，P.251 学会出版センター（1984）

4）W. Junge and H. T. Witt (1968) Z. Naturforsh. **23**b P. 244.

5）S. Itoh and S. Morita (1982) Biochim. Biophys. Acta **682** P.413.

6）K. Masamoto, K. Matsuura, S. Itoh and M. Nishimura (1981) Biochim. Biophys. Acta **638** P.108.

7）A. Baccarini-Melandri, R. Casadio, B. A. Melandri (1977) Eur. J. Biochem. **78**, P.389.

8）S. Schuldiner, E. Padan, H. Rottenberg, Z. Gromet-Elhanan, M. Avron (1974) FEBS Lett. **49**, P.174.

# 5章

# 形質転換

# 1．シアノバクテリア
## a．シアノバクテリアの形質転換法

岩井　雅子[1)]，広瀬　　侑[2)]，池内　昌彦[2)]

シアノバクテリアは真正細菌の一種として，相同組換による遺伝子操作がよく整備されているものが多いが，重要な種でも形質転換できないものもある．代表的な形質転換のプロトコルとともに今後の展望を述べる．

## Transformation of Cyanobacteria

We summarized principles and technical protocols for transformation of several representative species of cyanobacteria.

### 1.a.1　シアノバクテリアの形質転換の概要

#### 1.a.1.1　多コピーゲノム

大腸菌などと異なるシアノバクテリアの大きな特徴は，細胞内に複数のゲノムコピーが存在する点であり，例えば *Synechocystis* sp. PCC 6803 では一細胞当たり約 12 コピーのゲノム DNA が存在する[1)]．このため必須遺伝子を破壊するコンストラクトで形質転換しても，変異体は薬剤スクリーニングで容易に得られる．このとき野生型 DNA と変異体 DNA が細胞内に共存している．したがって，形質転換後にさらに 1～数ヶ月間培養を続けて，変異体 DNA が野生型から完全に分離する（segregation）を確認する必要がある．segregation の確認には感度が高い PCR 法がよく使われるが，その増幅効率は DNA の長さに逆の依存性があるので注意が必要である．一方，サザン法は DNA の長さにそれほど依存せず segregation の割合を推定することに適しているが，微量の DNA の有無を確認できるほどの感度はない．なお，segregation 途中であっても，必須遺伝子の変異体も含めて表現型が確認できることもある．

#### 1.a.1.2　形質転換法

シアノバクテリアの形質転換法としては，自然形質転換法，エレクトロポレーション法，接合法などが一般的である．自然形質転換は，単に DNA を細胞と混合するだけで細胞内に取り込まれて，相同組換でゲノムに組み換えられる現象であり，多くのシアノバクテリアで見られる（例：*Synechocystis* sp. PCC 6803，*Thermosynechococcus elongatus* BP-1，*Synechococcus elongatus* PCC 7942，*Synechococcus* sp. PCC 7002）．この取込には細胞表面の線毛やいくつかの遺伝子が必要である[2)]．一方，シアノバクテリアの多くは制限酵素をもっており，これが外来 DNA による形質転換を阻んでいる．接合による形質転換では，その制限酵素に対抗する DNA メチラーゼを組み込んだ大腸菌が使われている[3)]．今後は，ゲノム情報から推定した DNA メチラーゼ遺伝子を組み込むことで，これまで形質転換できなかった種の形質転換を可能にできるかもしれない．野外に生息するシアノバクテリアの多くは細胞外多糖類などを多量に分泌して細胞を保護している．このため，DNA を添加しても細胞に到達できないことも多い．細胞の生存率を保持したまま，このような細胞外物質を除去することはこれまで成功しておらず，今後の課題である．

#### 1.a.1.3　光合成遺伝子の操作

いくつかのシアノバクテリアは炭素源として有機物を取込み，従属栄養で増殖できる．たとえば，*Synechocystis* 6803 や *Plectonema boryanum* dg5 はグルコースを利用でき，*Anabaena variabilis* ATCC 29413 はフルクトースを，*Synechococcus* 7002 はグリセロールを利用できる．このような株では，光合成の必須遺伝子のノックアウトや部位特異変異導入などができる．一方，われわれは絶対独立栄養型の *Thermosynechococcus* にグルコース輸送体の遺伝子を組み込んで，光合成の必須遺伝子の操作を目指したが，これまでのところ従属栄養増殖を実現できていない．

1）東京理科大学応用生物学科
2）東京大学大学院総合文化研究科広域科学専攻生命環境科学系

## 1.a.2　形質転換各論

### 1.a.2.1　*Synechocystis sp.* PCC 6803

自然形質転換の報告は古くからあり，効率が非常に高い[4]．*Synechocystis* の特質はグルコース輸送体の遺伝子をもち，グルコースを供給することで光合成の必須遺伝子を完全にノックアウトできることにある．このとき，DuPont の Williams が開発したグルコース耐性株の使用が重要である[5]．グルコースは通常，培地に最終 5 mM ほど添加する．

**[実験方法] 代表的な自然形質転換法**

1．形質転換用 DNA を用意．プラスミド DNA の場合，環状を切断する必要なし，特別な精製も不要．
2．OD 730＝0.5－1.0 の細胞 1 mL に 1–5 $\mu$g の DNA を混合する．
3．薬剤の入っていない BG11 プレートにニトロセルロース膜（ミリポア，界面活性剤フリー，孔径 0.2 $\mu$m）をのせ，細胞/DNA を塗布する．
4．24時間，光照射（50 $\mu$E·m$^{-2}$·s$^{-1}$）する．
5．薬剤入りのプレートにニトロセルロース膜を移す．
6．1–2 週間，光照射（50 $\mu$E·m$^{-2}$·s$^{-1}$）する．
＊簡便法として，ニトロセルロース膜に細胞を塗布してから，DNA を 1–2 $\mu$L 滴下してもよい．この場合は，形質転換効率は低下するが，1 枚のプレートで多数の形質転換を行える．

**[その他の参考事項]**

・カナマイシン耐性カセット：Tn5 由来（pRL161）や Tn903 由来（pUC4K）などがある．いずれも readthrough 型で，挿入部位の下流の遺伝子の発現を許すので，オペロン中の遺伝子の破壊などに適している．カナマイシン濃度は 20〜100 $\mu$g mL$^{-1}$．
・クロラムフェニコール耐性カセット：pACYC184 由来．readthrough 型と思われるが，確かな証拠はない．クロラムフェニコールはエタノールに溶解し，最終濃度は 20 $\mu$g mL$^{-1}$．
・スペクチノマイシン耐性カセット：pRL453 由来．両側にオメガ因子のターミネータ配列がある[6]．スペクチノマイシン濃度は 20 $\mu$g mL$^{-1}$．
・エリスロマイシン耐性カセット：20 mg mL$^{-1}$ エタノール溶液を作製し，最終濃度は 20 $\mu$g mL$^{-1}$．コンストラクト作製時には大腸菌がエリスロマイシン耐性なので，100 $\mu$g mL$^{-1}$ 以上の高い濃度で選別する必要がある．
・このほかに，アンピシリンやハイグロマイシン，ゲンタマイシンなども使用例がある．
・DCMU：光化学系 II 阻害剤．10 mM エタノール溶液を作製，最終濃度 10 $\mu$M．
・グルコース：2 M 溶液を作製，フィルター滅菌，最終濃度 5 mM で使用する．ただし，*Synechocystis* は完全暗所ではグルコースによる従属栄養でも生育できない．1 日に 1 回，15 分程度光を照射する必要があり，light-activated heterotrophic growth という[7]．
・ニトロセルロースメンブレンフィルター：ミリポア社の HATF，孔径 0.2 $\mu$m．Advantec 社のものも代用可．〝detergent-free〟の方がコロニー出現率は高い．

**[実験方法] 表現型相補による新規遺伝子の同定**

2 回交叉型の自然形質転換能を利用して，変異株の変異部位を容易に同定できる．変異株だけが増殖できない培養条件で，その変異株に野生株または抑圧株由来のゲノム DNA またはそのライブラリーDNA を添加すると，形質転換した細胞だけが生育できるというのがその原理である（図 1）．変異株が増殖できる場合でも，増殖速度が大きくちがっていれば，表現型の相補を検出できる．このような方法で，これまでに実に多くの遺伝子が単離されている．

1．増殖できる株からゲノム DNA を単離し，いくつかの制限酵素で消化したものでまず相補を確認する．
2．相補できる DNA を低融点アガロース電気泳動などでサイズ分画し，相補できるサイズを求める．
3．サイズ分画した DNA を大腸菌にクローニングし，相補できるクローンを単離する．
4．相補できる DNA インサートの両端をシーケンスし，CyanoBase をサーチして領域を決定する．
5．相補できる DNA インサートの塩基配列に基づいて，約 1 kbp の断片に分割し，相補する領域を同定する．
6．こうして絞り込んだ相補できる領域を野生株と変異株でシーケンスし，変異部位を決定する．

**[具体例]**

図 1 は，メチルビオロゲン耐性株の DNA を野生株に添加して耐性を付与した結果を示す．培地は 10 $\mu$M メチルビオロゲンを含んでおり，100 $\mu$E·m$^{-2}$·s$^{-1}$ の光条件下で培養すると，発生する活性酸素によって野生株は死滅する．しかし，形質転換して耐性となった細胞だけが生育して，緑色のコロニーを形成する．この図では，大腸菌にクローニングした *Eco*RI 断片 4–6 kbp の各クロー

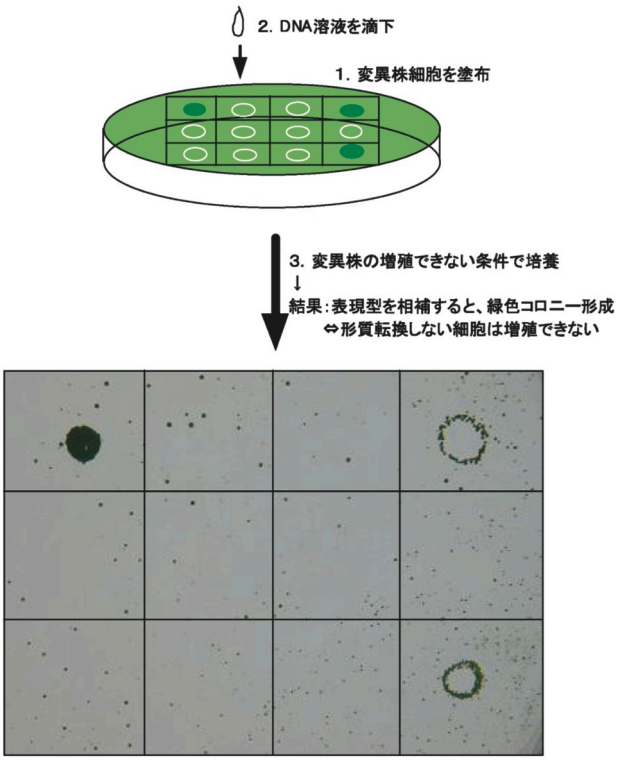



図1：*Synechocystis* 6803 の表現型相補の例．ここではメチルビオローゲンを含むプレートに野生株の細胞を塗布し，耐性株の DNA を分画したものをスポットした．特定の画分でのみ耐性コロニーが多数出現している．

ンによる相補の結果を示している．DNA 溶液を滴下したところ以外に生じたコロニーは，本来生育できない細胞から生じた自然抑圧変異体であり，これから DNA を単離してさらに抑圧のしくみを解析することも可能である．数十個から数百個のクローンをスクリーニングすればたいてい相補できる DNA を同定できる．そこで筆者らは，10 個ずつまとめた DNA を用いてスクリーニングし，相補できるものから個別クローンを同定する 2 段階のスクリーニングを行っている．また，大腸菌にクローニングできない場合，複数の制限酵素による相補できる断片のサイズを求め，CyanoBase をサーチするだけで領域を決定できることがある．なお，*Synechocystis* の形質転換は 2 回交叉型なので，プラスミドライブラリーDNA で相補してもプラスミド部分は挿入されておらず，プラスミドレスキューはできない．

［注］ゲノムライブラリーを作成するとき，制限マイナスの大腸菌を使用する．*Synechocystis* の修飾系はわかっていないが，通常の大腸菌でのクローニング効率は非常に低い．筆者らは，エレクトロポレーション用の XL1Blue MRF'（StrataGene）を使用している．なお，*Synechocystis* は，大腸菌の制限修飾系を拒否しない，つまり表現型相補などの形質転換において，PCR 産物とプラスミド DNA で効率に大差ない．

### 1.a.2.2 *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 および *T. vulcanus* RKN

好熱性シアノバクテリアはその遺伝子産物であるタンパク質の高い熱耐性と，光化学系複合体のようなタンパク質複合体の高い安定性を特徴としており，これを生かすためにはその遺伝子操作が必須である．*Thermosynechococcus elongatus* BP-1 に適用できる形質転換法には自然形質転換，エレクトロポレーション，接合法などがある．一方，*T. vulcanus* RKN では自然形質転換は確認されているが，エレクトロポレーションはこれまで成功していない．*T. vulcanus* RKN は電気パルスでの生存率が低いことがその理由かもしれない．本項では，当研究室の経験に基づいて，エレクトロポレーションと自然形質転換について述べる[8]．

［実験方法］

#### *T. elongatus* BP-1 のエレクトロポレーション

1．対数増殖期の *T. elongatus* BP-1 の細胞を用意する．定常期の細胞では効率は低い．dd$H_2O$ で細胞を洗浄し塩を除く．このときの遠心は室温で行う．細胞密度 $OD_{730}$＝20 になるように dd$H_2O$ に懸濁し，40 $\mu$L になるようにエッペンチューブに分注（約 $1\times10^9$cells $mL^{-1}$）．

2．コンストラクト DNA（3 $\mu$g $\mu L^{-1}$）を 4 $\mu$L 加えて混合し，エレクトロポレーション用セル（幅 2 mm）に移し，1 分間氷上におく．

3．電気パルスをかける．10 kV/cm，time constant 5 m 秒，10 $\mu$F コンデンサー，島津エレクトロポレーション装置 GTE10 を使用．

4．すぐに BG11 培地 1 mL を加える．

5．45°C で 24 時間，dim light（10–20 $\mu E\cdot m^{-2}\cdot s^{-1}$），120 rpm で振盪する．

6．溶解したトップアガー（0.75% バクトアガー／BG11）を 3 mL 加えて，薬剤入りのプレートにプレーティング．

7．トップアガーが固化後，インキュベータへ．培養条件：45°C，弱光（約 20 $\mu E\cdot m^{-2}\cdot s^{-1}$）．

＊トップアガーがある方が出現するコロニーが多いが，コロニーサイズは小さい（図 2）．

8．約 1 週間でコロニーが出現し，2 週間で 2 枚めのプレートへ移す．移す時はコロニーを P 20 のピペットマンで吸い取り，5–10 $\mu$L の BG11 培地で懸濁して，2 枚めのプレートにスポットして培養．

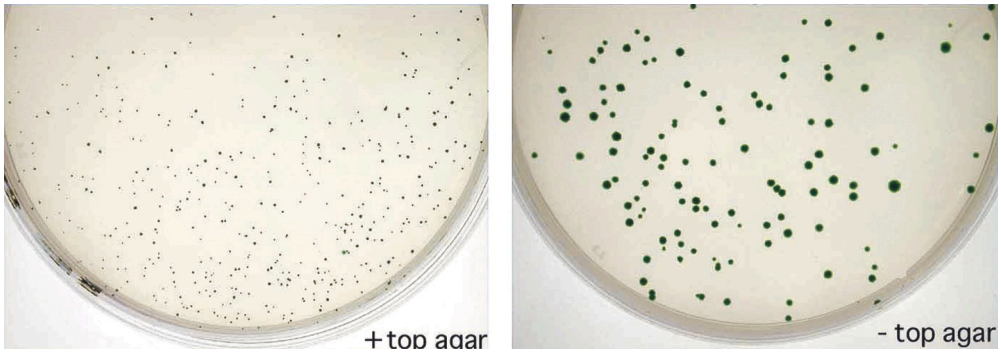



**図2**：*Thermosynechococcus elongatus* BP-1 のエレクトロポレーションによる形質転換の例．左のトップアガーを用いた場合は，コロニーサイズは小さいが，出現したコロニー数は非常に多い．

＊通常，1週間で3枚めに移せ，さらに1週間で4枚めに移せる．3，4枚めのプレートで生育している細胞を白金耳でかき集め，ゲノム DNA を単離して segregation チェックを行う．多くの変異体はこの段階で segregation が完了している．

＊プラスミド DNA は $ddH_2O$ に対して透析し，塩を除く．

＊エレクトロポレーション法は *T. vulcanus* RKN には適用できない．

＊ *T. vulcanus* RKN はエレクトロポレーションによる形質転換はできない．また，自然形質転換効率も低い．もし，形質転換が難しいときは，筆者らは，*T. elongatus* BP-1 と非常に近縁関係にあることを利用して，まず *T. elongatus* BP-1 にエレクトロポレーションで変異を導入する．さらに，そこから変異体ゲノム DNA を単離して，ゲノム DNA による自然形質転換によって *T. vulcanus* RKN の変異体を得ている[9]．

### ［実験方法］自然形質転換法

どちらの株にも同じように適用できる．プロトコルは，パルスをかけないことを除けば，エレクトロポレーション法に近い．

1．対数増殖の細胞を濃縮し，$OD_{730}$＝20 で 40 μL になるようにエッペンチューブに分注．

2．コンストラクト DNA（～3 μg $\mu L^{-1}$）を 4 μL 加えて，室温で 5–10 分インキュベートする．

＊この時間や光条件を最適化することで形質転換効率が高くなる可能性がある．

3．BG11 培地を 1 mL を加える．あとはエレクトロポレーション法と同じである．

＊自然形質転換の効率はエレクトロポレーションよりも低く，*Synechocystis* の自然形質転換効率より非常に低いので，高い濃度のプラスミド DNA を用意する必要がある．

### ［参考事項］

・制限系：これまでに *T. elongatus* BP-1 には CGCG を認識する II 型制限酵素 *Sel*I の存在や，ゲノム DNA の RGATCY 配列が特異的にメチル化を受けていることなどが知られているが，これらが形質転換の障害となっているかどうかは不明である．一方，ゲノム配列から I 型制限系の遺伝子（*tll2228-tll2230*）が発見された．このうちの制限系の *tll2230* を破壊した株は有意に形質転換効率が高く，必要に応じて形質転換の親株として使用されている[8]．

・薬剤耐性：これまで *Synechocystis* で長年使われてきたカナマイシン耐性カセット，クロラムフェニコール耐性カセット，スペクチノマイシン／ストレプトマイシン耐性カセットなどが使われてきた（表1）．注意を要するのは，培養温度が高いと抗生物質の効力の低下がみられることで，2週間以上培養したものは耐性カ

**表1**：*Thermosynechococcus* の選択に使用する薬剤耐性カセットと抗生物質濃度．

| 薬剤耐性カセット | 由来 | 薬剤濃度（μg $mL^{-1}$） | |
|---|---|---|---|
| | | 液体培地 | プレート |
| クロラムフェニコール耐性カセット | pACYC184 | Cm 5～7 | Cm 3.4 |
| Sp/Sm 耐性カセット | pRL453 | Sp 5＋Sm 10 | Sp 5＋Sm 10 |
| カナマイシン耐性カセット | pRL161（Tn5 由来） | Km 40～80 | Km 40～80 |

Cm：クロラムフェニコール，Sp：スペクチノマイシン，Sm：ストレプトマイシン，Km：カナマイシン

セットを持たない細胞でも増殖できるようになるので注意が必要である．また，耐熱性生物のカナマイシン耐性遺伝子を利用したカセットも作製されている[10]．擬陽性のコロニーがカナマイシン耐性，スペクチノマイシン／ストレプトマイシン耐性では生じるので注意が必要であるが，クロラムフェニコール耐性の擬陽性は生じたことがない．そのため，共通のプラットフォーム作製のためのカセットには前者を用い，個々の遺伝子破壊などでは後者のカセットを使用している．

- 温度：われわれは通常 45℃でスクリーニングや segregation のための培養を行っている．この温度は本来の最適増殖温度より 10℃以上低いが，使用しているカセットが中温性生物由来であること，また上述したように抗生物質自身の安定性も考慮したためである．また，実際の形質転換効率も 45℃の方が 50℃よりも有意に高かった．
- 組換様式：これまでに相同 2 回交叉と相同 1 回交叉が報告されているが，前者が普通である．後者は *psbTc* 付近の DNA を使用したとき非常に高かったが，ほかの部位の DNA では成功していないので，まだ適用は限定的である．
- 接合法：ブロードホストベクターRSF1010 をベースとしたシャトルベクターも開発されている[11]．
- プロモータ：われわれはこれまで多数の内在プロモータや外来プロモータを試みたが，まだ十分なコンセンサスはない．内在のプロモータはコンストラクト作製時に大腸菌で発現するものとしないものがある．*T. elongatus* BP-1 の *psbAI* プロモータは大腸菌で強く発現し，毒性のある遺伝子の多コピーベクターへのクローニングができなかったことがある．
- コンストラクト設計：組換え効率は *Synechocystis* よりもかなり低いので，カセットの両側の相同領域は上流，下流とも各 1 kbp 以上必要である．われわれは約 1.5 kbp くらい用意している．

### 1.a.2.3 *Nostoc punctiforme* ATCC 29133

*Nostoc punctiforme* ATCC 29133（以後 *Nostoc* 29133 と略）は，ホルモゴニア（連鎖体）を形成して滑走運動する，緑／赤色光に応答して光合成の集光装置の合成を調節する（補色適応）など，興味深い現象を示す．これまで窒素固定遺伝子やヘテロシスト形成の研究には，*Anabaena* 7120 がおもに使われてきたが，*Anabaena* 7120 には窒素固定以外の現象がほとんど見られない（Nostoc 29133 で同定される遺伝子の多くは *Anabaena* 7120 にも存在するので，一種の変異体かもしれない．）．そのため，*Nostoc* 29133 のゲノム決定後は注目を浴びているが，日本ではまだ研究者が少ない．筆者らは，Jack Meeks 教授（米・カリフォルニア大学）の指導を受けて *Nostoc* 29133 の形質転換に成功した．この方法は煩雑であるが，*Nostoc* 29133 はこれから注目される生物なので，ここで詳しく紹介する．*Nostoc* 29133 の形質転換法は Jack Meeks 教授のホームページ[12]にも記載されているが，筆者らは一部を改変している．全般的には大腸菌の接合を用いた *Anabaena* 属の形質転換法に準じている[13]．*Nostoc* 29133 の形質転換は，①接合に用いる大腸菌体量が少ない，②擬陽性コロニーの数が多い，③適切な薬剤カセットの使用が必要，という点において，*Anabaena* 7120 の形質転換と異なっている．

**[実験方法]**

1．使用菌株とプラスミドの準備

①モビライザープラスミド（pRK2013：クロラムフェニコール耐性）とヘルパープラスミド（pRL528：カナマイシン耐性）を形質転換した大腸菌 HB101．Jack Meeks 教授より取り寄せが可能．

②カーゴプラスミド（pRL271：クロラムフェニコールおよびエリスロマイシン耐性）のマルチクローニングサイトにコンストラクトをクローニングし，大腸菌 HB101 へ形質転換．相同組み換えには薬剤カセットの上流・下流には 1 kbp 以上の配列が必要．

③*Nostoc* 29133 細胞

AA 培地（1 章 2 参照）に 5 mM MOPS，2.5 mM $NH_4Cl$，pH＝7.8（最終）を加え，$ddH_2O$ を加えて 4 倍に希釈する（以下，AA/4＋N 培地という）．約 100 mL の AA/4 培地で *Nostoc* 29133 を $OD_{730}$＝1-2 程度まで液体培養する（BG11 でも代用できるかもしれない）．

2．*Nostoc* 29133 細胞の準備

①約 100 mL の AA/4＋N 液体培地で育てた *Nostoc* 29133 を，フィラメントあたり 4-6 個の細胞になるように超音波処理し，その後，数時間回復培養させる．

②クロロフィル *a* 濃度を測定する．細胞を遠心して沈殿させ，上清を除き，メタノールを加えてボルテックスする．その後，遠心した上清を波長 665 nm の吸光度（$A_{665}$）で測定する．クロロフィル *a* 濃度は次の式を用いて算出する．

$$\text{クロロフィル } a \text{ 濃度}(\mu g\ mL^{-1}) = 12.7 \times A_{665} \quad (式\ 1)$$

③大腸菌の回収を行なう直前に，*Nostoc* 29133 の細胞を室温で遠心する．クロロフィル濃度 75-100 $\mu$g

$mL^{-1}$（約 0.75－1.0 x $10^8$cells $mL^{-1}$）になるように AA/4＋N 培地を加え，細胞培養液とする．

3．大腸菌の準備

①大腸菌 HB101（pRL271）と HB101（pRK2013，pRL528）をそれぞれ 100 mL の抗生物質入りの LB で培養し，$OD_{600}$＝約 0.6 まで培養する．培養液を混合し，計 200 mL とする．

②室温で遠心して細胞を回収し，抗生物質を含まない LB 培地を加えて懸濁し，再び室温で遠心（細胞の洗浄），

③同じ作業をもう一度繰り返す．ペレットの状態で長時間放置しないこと．10 mL の抗生物質を含まない LB 培地に懸濁し，大腸菌混合液とする．

4．接合

①AA＋N＋LB 培地のプレート（5 mM MOPS，pH＝7.8，2.5 mM $NH_4Cl$，0.5% LB，1％バクトアガー）を 10 枚作製し，ニトロセルロースメンブレンフィルター（HATF，孔径 0.45 $\mu$m，Millipore）を密着させる．

②エッペンチューブに 0.5 mL の大腸菌混合液と 0.5 mL の *Nostoc* 培養液を加えて混合し，室温で 30 秒間遠心する，上清 600–700 $\mu$L を捨て，ペレットを穏やかに懸濁する．そして，懸濁液全量をできるだけ均一にフィルターに塗り広げる．細胞数が多い部分は抗生物質が効かないので注意．

⑤プレートをパラフィルムで封し，1％ $CO_2$，弱光（2–3 W $m^{-2}$）の元で一晩培養．

⑥フィルターを LB を除いた AA＋N 培地のプレートに移し，弱光で 2 日間培養．

⑦通常光（4–6 W $m^{-2}$）へプレートを移し，2 日間培養．

⑧フィルターを適切な抗生物質入りのプレートに移し，通常光で 2 週間程度培養するとコロニーが出現する．コロニーの出る個数はプレート間でのばらつきが大きい．以後，全ての培養は通常光のもとで行なう．

5．*sacB* による選別

①1×1 cm で区画わけをした抗生物質入りの AA プレートを用意する．

②出現したコロニーを 1 つずつ滅菌した爪楊枝でつつき，それぞれを区画に植えついでいく．破壊する遺伝子にもよるが，8–9 割以上のコロニーは植えついだ後に死んでしまうので，なるべく多くのコロニーを拾うこと．

③通常光の下で 1 週間程度培養すると，薬剤耐性をもつコロニーが現れてくる．このコロニーを別のプレートに塗り広げて培養を続ける．

④育ったコロニーをエッペンチューブにかきとり，300 $\mu$L の AA/4＋N 培地を加えて懸濁する．そして，穏やかに超音波処理する．

⑤5％のショ糖および抗生物質を加えた AA プレートに細胞を撒き，通常光の下で 1 週間程度培養するとコロニーが現れる．筆者の経験では，ショ糖選択における擬陽性はかなり少ない．

6．薬剤耐性カセットの挿入の確認

①5％のショ糖および抗生物質を加えた AA プレートで生育してきたコロニーを，別の抗生物質のみを加えた AA プレートに塗り広げて培養する．

②育ってきた細胞の少量をかきとり，エッペンチューブに入れる．200 $\mu$L の TE　pH 8.0 と 1％(v/v) Triton X-100 を加え，よくピペッティングする．少量の寒天は混入しても問題ない．

③95℃，3.5 min 処理する．溶液が濁る．

④200 $\mu$L のクロロホルムを加え，ボルテックスをし，5 分間遠心する．その後水層を回収する．

⑤上記の操作をもう一度繰りかえす．

⑥得られた水層を DNA の鋳型として PCR を行い，ゲノム上の DNA が完全に薬剤カセットと置き換わったことを確認する．もし置き換わっていなければ，ショ糖選択を行なう前の細胞を何回か植え継ぎ，置き換わるのを待つ．

**注意事項**

＊大腸菌は 4℃で保存しておくと徐々に死滅するので，－80℃のフリーズストックを作製しておく．

＊*sacB* の遺伝子は変異が入りやすいので，形質転換前に pRL271 を持った大腸菌をショ糖入り LB プレートに塗り広げ，コロニーが現れないことを確認すること．

＊*Anabaena* 7120 よりも大腸菌の量が少ない．

＊*sacB*；レバンスクラーゼ遺伝子．異常な糖転移産物を蓄積させて致死させる条件致死遺伝子．

＊1 回目の組換（integration）によって Cm（Em＋Nm）耐性のコロニーが生じる．この組換えは挿入カセットのどちらか片側の相同領域で起こる．こうして，プラスミド全体がゲノムに組み込まれる．一方，2 回目の組換（resolution）が挿入カセットの反対側で起きると，*sacB* を含むプラスミドのベクター部分が脱落し，5％ショ糖に耐性のコロニーを生じる．また，このとき 1 回目に組換えた側で再び組換えが起こると，挿入されたプラスミド全体が脱落しショ糖耐性は回復するが，挿入カセットのネオマイシン耐性も失う．この原

理は，*Anabaena* の形質転換でも同じである．

＊大腸菌の pRL271 のコンストラクトが完成後，大腸菌をショ糖プレートに塗り広げ，コロニーが出ないことを確認すること．

＊*Nostoc* 29133 の形質転換に使用する抗生物質の濃度 Neomycin 25 $\mu$g mL$^{-1}$，Ampicillin 10 $\mu$g mL$^{-1}$，Erythromycin 10 $\mu$g mL$^{-1}$，Chloramphenicol 60 $\mu$g mL$^{-1}$，Streptomycin 1 $\mu$g mL$^{-1}$．なお，Kanamycin には本来耐性なので使用できない．

＊*Nostoc* 29133 はカナマイシン耐性を持つため，スクリーニングにはネオマイシンを用いる必要がある．また，*Anabaena* 7120 でよく使われるストレプトマイシン／スペクチノマイシン耐性の Ω カセットは，十分な耐性を付与しないので，*Amaranthus hybridius* の *psbA* プロモーターとネオマイシンホスホトランスフェラーゼ（*npt*）を融合させたカセットが開発されている（プラスミド pSCR9）[14]．

### 1.a.2.4 その他のシアノバクテリアの形質転換

・*Synechocystis* 6803 と並んで，古典的な自然形質転換法が確立されいる株は *Synechococcus elongatus* PCC 7942 と *Synechococcus* sp. PCC 7002 である．前者は絶対独立栄養だが，形質転換能が非常に高い．後者はグリセロールを炭素源として従属栄養増殖ができるので，光合成関連の遺伝子をノックアウトが可能．

・アオコを形成する単細胞性の *Microcystis aeruginosa* PCC 7806 は自然形質転換による遺伝子破壊の報告がある[15]．しかし，*Synechocystis* 6803 と比べるとかなり効率は低い．

・乾燥耐性でもっとも有名でよく研究されている *Nostoc commune* は形質転換の報告はない．しかし，単細胞性で乾燥耐性が非常に強い *Chroococcidiopsis thermalis* PCC 7203 はエレクトロポレーションと接合によって形質転換できる[16]．

・*Plectonema boryanum* IAM-M101 strain dg は糸状性で窒素固定するとともに完全暗所でグルコースで生育する．この株ではエレクトロポレーションによる形質転換が報告されており，プラスミドレスキューも可能である[17]．

・商業的に重要な種であるいわゆるスピルリナ（*Arthrospira* sp. PCC 9438）の形質転換法は非常に複雑な手法で報告されている．具体的には，トランスポゾン，トランスポザーゼをリポソームに組み込んでエレクトロポレーションによって細胞内へ導入している[18]．*Arthrospira* は 6 種もしくはそれ以上の制限酵素を持っており，大腸菌などで増幅したプラスミド DNA を供与体として使用するのは現実的に難しい．

・海洋性 *Synechococcus* の場合，接合によってブロードホストベクターと自殺ベクターを導入することによって目的の遺伝子の破壊に成功した例もある[19]．この手法は，WH 8102 株，WH 8103 株，WH 7803 株で適応できるという．

・最後に，原始的な *Gloeobacter violaceus*，クロロフィル *d* をもつ *Acaryochloris marina*，海洋性窒素固定型 *Cyanothece*，海洋性で主要な生態的地位を占める *Prochlorococcus marinus* なども，形質転換は成功していない．DNA の取込や制限系など問題点が洗い出されてきており，ゲノム情報を利用して，今後は新しい展開が期待できるだろう．

## 参考文献


1）J. Labarre, F. Chauvat, & P. Thuriaux, J. Bacteriol. **171** (1989) P.3449.

2）S. Yoshihara, X. Geng, S. Okamoto, K. Yura, T. Murata, M. Go, M. Ohmori, & M. Ikeuchi, Plant Cell Physiol. **42** (2001) P.63.

3）J. Elhai, A. Vepritskiy, A. M. Muro-Pastor, E. Flores, & C. P. Wolk, J. Bacteriol. **179** (1997) P.1998.

4）G. Grigorieva, & S. Shestakov, FEMS Microbiol. Lett. **13** (1982) P.367.

5）J. G. K. Williams, Methods Enzymol. **167** (1988) P.766.

6）P. Prentki, & H. M. Krisch, Gene **29** (1984) P.303.

7）S. L. Anderson, & L. McIntosh, J. Bacteriol. **173** (1991) P.2761.

8）M. Iwai, H. Katoh, M. Katayama, & M. Ikeuchi, Plant Cell Physiol. **45** (2004) P.171.

9）早乙女敏行，修士論文（2005）．

10）K. Onai, M. Morishita, T. Kaneko, S. Tabata, & M. Ishiura, Mol. Genet. Genomics **271** (2004) P.50.

11）U. Muhlenhoff, & F. Chauvat, Mol. Gen. Genet. **252** (1996) P.93.

12）http://microbiology.ucdavis.edu/meeks/

13）得平茂樹，佐藤直樹，「窒素固定能をもつ *Anabaena* 属ラン藻の遺伝子操作」，化学と生物 **39**（2001），P.121．

14）M. F. Cohen, & J. C. Meeks, Mol. Plant Microbe Interact. **10** (1997) P.280.

15）E. Dittmann, B. A. Neilan, M. Erhard, H. von Dohren, & T. Borner, Mol. Microbiol. **26** (1997) P.779.

16）D. Billi, E. I. Friedmann, R. F. Helm, & M. Potts, J. Bacteriol. **183** (2001) P.2298.

17）Y. Fujita, H. Takagi, & T. Hase, Plant Cell Physiol. **37** (1996) P.313.

18）Y. Kawata, S. Yano, H. Kojima, & M. Toyomizu, Mar. Biotechnol. **6** (2004) P.355.

19）B. Brahamsha, Appl. Environ. Microbiol. **62** (1996) P. 1747.

# 1．シアノバクテリア
## b. PCRを使った*Synechocystis*の高速簡便遺伝子破壊法

佐藤　直樹[1)]

外来DNAを取り込む性質のある*Synechocystis* sp. PCC6803では，遺伝子破壊のために必要な遺伝子破壊コンストラクトをPCRによって簡便に作ることができ，多数の遺伝子破壊を平行して行うことができる．

## A rapid method for gene disruption in *Synechocystis*

Naoki SATO

A rapid and convenient method for making DNA constructs to be used in gene disruption in *Synechocystis* sp. PCC6803 is presented.

### 1.b.1　はじめに

1996年にシアノバクテリアとして最初にゲノム塩基配列が決められた*Synechocystis* sp. PCC6803は，外来DNAを容易に取り込み，相同組換えによって，遺伝子ターゲティングが容易にできる．これまで，薬剤耐性カセットによって分断した遺伝子を含むプラスミドによる遺伝子破壊や，変異株のゲノムDNA・プラスミドクローンによる相補を利用したクローニング[1)]などが行われている．これまで多くの研究では，遺伝子破壊コンストラクトとしてプラスミドが用いられてきたが，これには目的の遺伝子を含むDNA断片のプラスミドへのクローニング，遺伝子内部の制限部位における切断，薬剤耐性カセットの挿入，という3つの段階を踏む必要がある．適当な遺伝子内部の制限サイトがない場合も多く，また，遺伝子によっては，プラスミドへのクローニングがうまくできないこともある．筆者の研究室でも以前は，遺伝子破壊コンストラクトを1個作るために1ヶ月程度要することも稀ではなかった．近年，PCRを利用した遺伝子改変技術が進歩し，これを活用することによって，クローニングを経ることなく容易に融合遺伝子を作ることができるようになった．本稿ではその一例として，相同組換えに使う薬剤耐性カセットを含んだ直鎖DNAの作製とそれによる形質転換[2,3)]について述べる．このような遺伝子破壊法の基本は前項1.aに述べられているので，ここでは，本法に特有の事柄を中心として解説する．

1）東京大学大学院総合文化研究科

### 1.b.2　PCRを用いた遺伝子破壊コンストラクトの作製

図1に方法の概略を示す．全部で4個のDNAをPCRによって増幅し，これを順次つないでいく．すべてを一度につなぐということもよく行われるが，失敗した場合にどこが悪いのか全くわからず，また，多くの場合，複数のバンドが出るため，あまり適切ではない．少し手間がかかるが，3回にわけてPCRを進めることにする．なぜ薬剤耐性カセットを分断するのかという疑問があるかもしれない．このようにすれば，最後にできる正しいコンストラクト以外のDNAが細胞に入っても薬剤耐性を与えることはないからである．PCR自体は，各研究室で行われている方法を利用すればよい．

本法で用いるプライマーは表1にまとめた．プライマーの長さは研究室ごとに好みがある．プライマーの設計は経験に頼らず，適当なプライマー設計プログラムを利用するのがよい．私の場合，長いにこしたことはないと思ってだいたい25塩基くらいで設計しており，ATに富む場合は，さらに長くしている．また，参考までに，研究室で使っているPCRのプロトコルを表2，3に示した．実際に研究室で使っている装置は，BioRad社のiCyclerである．酵素としてはごく一般的なタカラのExTaqを用いているが，特に変異率を低く抑えたい場合には他の適当な酵素を利用することをお薦めする．

まず，カナマイシン耐性カセットを2つに分けて増やす．私たちはpUC4Kというプラスミドに入っているカナマイシン耐性カセットを使った．どこで分割しても構わないが，分割した2つの断片は互いに重なり合うよう

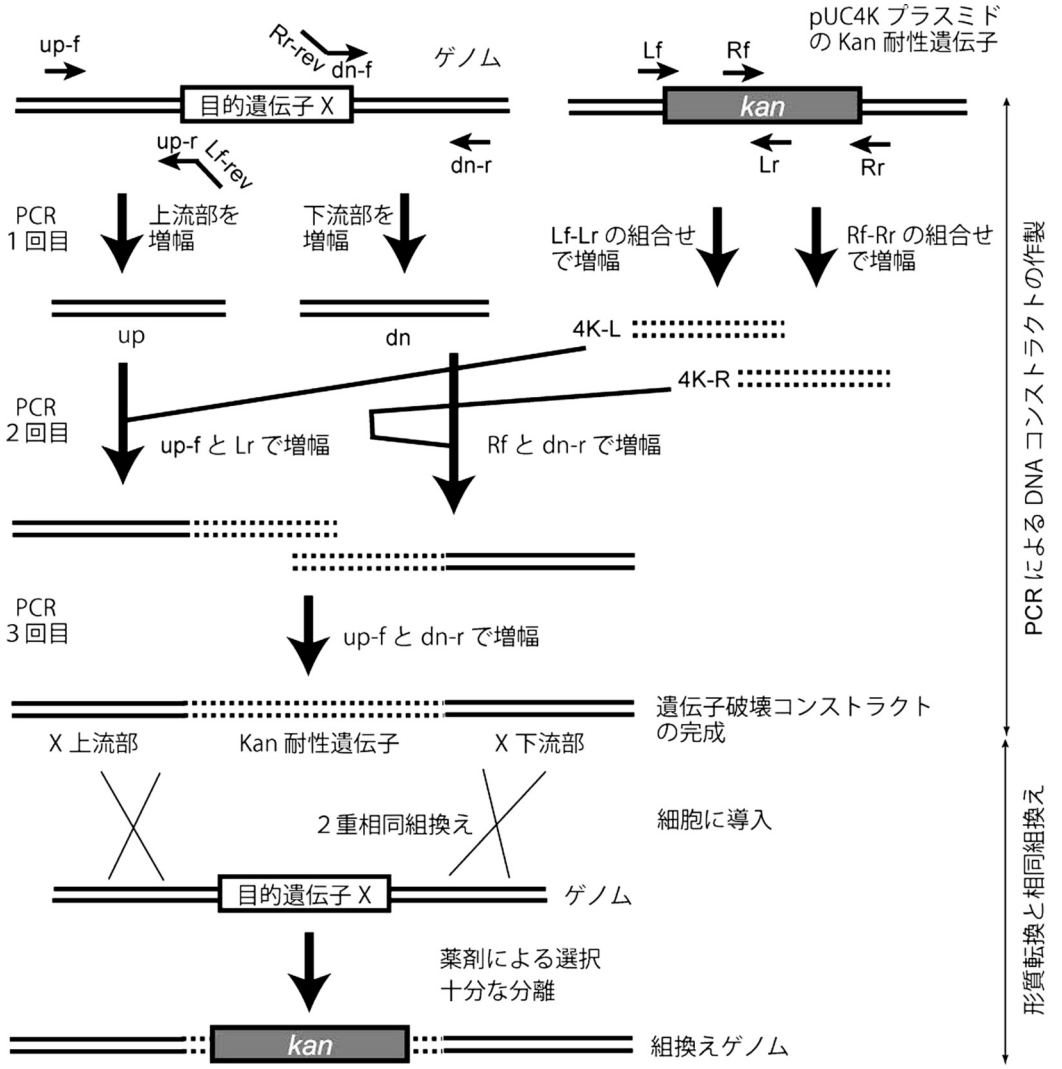



**図 1**：PCR を用いた遺伝子破壊コンストラクトの作製

にする．ここでは，上流半分 4K-L（707 bp）と下流半分 4K-R（457 bp）としている．重なりは 50 bp となる．このカナマイシン耐性遺伝子は昔の GC テール法でクローニングされているので，上流側はGが並んでいるつなぎの部分のすぐ隣から使うことでプロモータを確保し，下流側は終始コドンの 150 塩基ほど後ろまで含むようにしてある（表 1）．他の耐性カセットを使う場合には適宜考えればよい．次に，目的遺伝子の上流約 1 kbp の領域を増やすようにプライマーup-f と up-r を設計する（図 1）．up-r については，その 5’ 側に，カナマイシン耐性カセットの 5’ 末端を増やすプライマーLf と相補的な配列である Lf-rev をつけた形で合成する．同様に，下流側につい

**表 1**：本方法で用いる PCR プライマー

| 名称 | 配列（5’-＜3’） |
|---|---|
| 4K-Lf | AGCCACGTTGTGTCTCAAAATCTCTGATGT |
| 4K-Lr | GAGAAATCACCATGAGTGACGACTGAATCC |
| 4K-Rf | AAGCTTTTGCCATTCTCACCGGATTCAGTC |
| 4K-Rr | AGAGCTTTGTTGTAGGTGGACCAGTTGGTG |
| Lf-rev – up-r | ACATCAGAGATTTTGAGACACAACGTGGCT－（遺伝子ごとに設計） |
| Rr-rev – dn-f | CACCAACTGGTCCACCTACAACAAAGCTCT－（遺伝子ごとに設計） |
| up-f | 遺伝子ごとに設計 |
| dn-r | 遺伝子ごとに設計 |

**表 2**：PCR 反応の組成

| | |
|---|---|
| 滅菌蒸留水 | 76.5 μl |
| 10 x PCR 緩衝液 | 10 |
| 2.5 mM dNTP 混合液 | 8 |
| 5 mM プライマー 1 | 2 |
| 5 mM プライマー 2 | 2 |
| 変性 DNA テンプレート | 1 |
| ExTaq | 0.5 |
| 全量 | 100 |

ゲノム DNA やプラスミド DNA は，アルカリ変性したものを用いると増幅効率が高い．すなわち，1 μg/μl 程度の DNA を 1 μl とり，9 μl の 2 N KOH，2 mM EDTA を加えて，37°C で 10 分間処理した後，1 μl の 2 N 酢酸を加えて中和する．さらに 90 μl の滅菌蒸留水を加える．通常さらに 5 倍程度希釈して PCR に用いる．−20°C で保存する．

ても一方は複合したプライマーとしておく．通常，遺伝子を完全に欠損した変異株を作ることを考えるので，コード領域はほとんど含まない形で，上流側と下流側を別々に増やしている．但し，隣の遺伝子が近接している場合には，その発現に影響しないように配慮する必要がある．また，図 1 では，遺伝子の向きは指定していない．しかし，目的遺伝子 X の下流側にも遺伝子が並んでいる場合，共転写されているかどうかはわからないにしても，極性効果により下流側の転写ができなくなるのを避けるため，カナマイシン耐性カセットの転写方向と目的遺伝子 X の転写方向をそろえておくのが無難である．

こうして 1 回目の PCR で，4 個の DNA を作る．できた DNA はミニゲル電気泳動で確認し，DNA 精製キット（GE ヘルスケア社 GFX など）により精製する．100 μl の反応液から得られた DNA を 50 μl の純水に溶かしておく．

次に DNA を 2 個ずつ結合する．これは，目的遺伝子の上流部と下流部を増幅する際に用いた複合プライマーに含まれるカナマイシン耐性遺伝子の末端配列を利用する．up と 4K-L，dn と 4K-R をそれぞれアニーリングして，1 回の伸長反応を行う（表 4，5）．このときはプライマーを使わず，アニーリング効率を高めるため，高濃度

**表 4**：接続反応の組成

| | |
|---|---|
| 滅菌蒸留水 | 68.5 μl |
| 10 x PCR 緩衝液 | 10 |
| 2.5 mM dNTP 混合液 | 1 |
| DNA 1 | 10 |
| DNA 2 | 10 |
| ExTaq | 0.5 |
| 全量 | 100 |

なお，DNA の量は適宜変更してもよく，その場合，水の量を加減する．

**表 3**：PCR 反応のプログラム

| サイクル | ステップ | 温度（°C） | 時間 |
|---|---|---|---|
| 1（x 1） | 1 | 96 | 2 分 |
| 2（x 4） | 1 | 95 | 30 秒 |
| | 2 | 55 | 1 分 30 秒 |
| | 3 | 72 | 2 分 |
| 3（x 25） | 1 | 95 | 30 秒 |
| | 2 | 57 | 1 分 30 秒 |
| | 3 | 72 | 2 分 |
| 4（x 1） | 1 | 72 | 10 分 |
| 5（x 1） | 1 | 10 | 0（無限） |

この条件はかなりゆるめの条件なので，もう少しアニーリング温度（ステップ 2）を高くしてもよい．また，短い DNA を増やす時は，ステップ 2 と 3 の時間も短くしてよい．

の DNA を使って反応する．結合する 2 つの DNA の濃度があまり大きく異ならないように留意する．反応後，DNA の一部をとり，純水で 50-200 倍に希釈する．このとき，いくつかの希釈率を試すのがよい．濃すぎると次の PCR 産物が複数バンドになり，薄すぎると何も増えない．

この希釈液をテンプレートとして，2 回目の PCR を行う．条件は表 2，3 の通り．プライマーはそれぞれ，up-f と Lr，および Rf と dn-r である．産物を電気泳動で確認し，DNA を精製する．

こうして得られた 2 つの DNA を上記と同様にして結合し，PCR で増幅する．この 3 回目の PCR が曲者で，多数のバンドが出ることが多い．その場合，目的のバンドをピペットで吸い出して，再度 PCR で増幅すると，1 本のバンドになることが多い．但し再び多数のバンドになることもある．この際，ゲルを切り出して GeneClean などのキットで精製するというような必要はなく，先の細い微量ピペットで 1 μl 程度吸い出せばよい．

## 1.b.3　相同組換えによる遺伝子破壊株の取得

ひとたび DNA コンストラクトが完成すれば，あとは難しくない．基本的な形質転換の方法については前項 1.a を参照していただくとして，ここでは *Synechocystis* の

**表 5**：接続反応のプログラム

| ステップ | 温度（°C） | 時間 |
|---|---|---|
| 1 | 95 | 5 分 |
| 2 | 55 | 1 分 |
| 3 | 72 | 10 分 |
| 4 | 10 | 0（無限） |

ステップ 2 に進む段階のアニーリングを，時間をかけてゆっくりと温度を下げるようにすればもっとよいかもしれない．

形質転換について述べる．100 ml の三角フラスコに 25 ml 程度の BG11 培地をいれ，*Synechocystis* のシングルコロニーを植え込む．なお，私たちは 1 mM の $NaHCO_3$（炭酸水素ナトリウム）を添加している．30℃で数日間，30 $\mu$E $m^{-2}s^{-1}$ 程度の白色蛍光灯（15–20 W のランプを使い，20 cm 程度離す）で培養する．750 nm の吸光度（濁度）が 0.5 程度の対数期の細胞を用いる．100 $\mu$l の培養液をマイクロチューブに取り，できあがった PCR 産物（精製品）を 20 $\mu$l 加える．量は適宜変更してもよい．1.3%寒天を含む新鮮な BG11 培地の上にセルロースアセテートフィルター（0.45 $\mu$m 口径のもの，アドバンテック製など，パッケージのものをそのまま用い，オートクレーブする必要はない）を滅菌したピンセットで載せ，この上に上記の細胞液をスプレッダーで広げる．軽く広げる程度で，刷り込まないこと．クリーンベンチで表面を乾かし，シャーレをテープ（パラフィルムを切って用いている）で巻いて，光を弱くして 1 日間培養を行う．なお，寒天培地の場合，BG11 培地には 0.05% $Na_2S_2O_3$（チオ硫酸ナトリウム）と 1 mM $NaHCO_3$ を添加しておくことで，プレート効率が高まるとされている．

1 日または 2 日経って，フィルター表面がうす緑色になったら，フィルターを滅菌ピンセットではがし，30 $\mu$g/ml のカナマイシンを含み 1.3%寒天で固めた新鮮な BG11 培地に載せる．パラフィルムでシールし，今度は 20–30 $\mu$E $m^{-2}s^{-1}$ 程度の光を当てて培養する．特に明暗周期をつける必要はなく，多くの研究室は連続明期で培養している．数日で細胞は白くなるが，1 週間を過ぎると小さなコロニーが見えてくる．これが形質転換体である．十分にコロニーが大きくなったら，白金耳で 30 $\mu$g/ml のカナマイシンを含み 1.3%寒天で固めた新鮮な BG11 培地に移す．あとは，シングルコロニーを広げて植える作業を数回繰りかえす．

コロニーが遺伝子破壊株であることを確認するには，コロニーPCR を行う．ただし，大腸菌のプラスミドのスクリーニングの場合とは異なり，1 回の PCR では十分に DNA が増えないことが多い．通常，まず，up-f と dn-r で増やし，その産物の一部（0.5 $\mu$l）を使って，2 回目の PCR を行う．その場合，up-f と Rr または Lf と dn-r の組み合わせを用いてカナマイシン耐性カセットを含む形質転換体を確認する．*Synechocystis* のゲノムはマルチコピーなので，完全に野生型コピーがなくなっていることを確認するため，目的遺伝子 X の内部配列を一方のプライマーとし，他方は up-f または dn-r を用いて PCR を行う（論文[3] 参照）．候補株が見つかったら，液体培養で殖やし，更に詳細な確認をする．

## 1.b.4　おわりに

この方法は非常に簡単で，同時に多数の遺伝子を扱うこともできる．月曜日にプライマーがあれば，PCR のやり直しを含めても，金曜日には形質転換までいくことができる．一人でも，1 週間で 8 個程度の遺伝子破壊が余裕をもってできる（選抜の段階は別）．元気のある研究者ならばその 2 倍でも可能であろう．*Synechocystis* の遺伝子は約 3,000 個なので，準備が順調にできれば，フルに働けば一人でも 1 年間で終わる計算である．筆者らは，このようにして 40 個の遺伝子破壊を行い，変異株の光合成特性などを調べた[2,4]．

## 参考文献


1）H. Wada, Z. Gombos, & N. Murata, Nature **347** (1990) p.200.

2）N. Sato, M, Ishikawa, M. Fujiwara, & K. Sonoike, Genome Informatics **16** (2005) p.56.

3）I. Sakurai, N. Mizusawa, H. Wada, & N. Sato, Plant Physiol. **145** (2007) p.1361.

4）M. Ishikawa, M. Fujiwara, K. Sonoike & N. Sato, *Plant Cell Physiol*.（オンライン版）doi : 10.1093/pcp/pcp027

# 2．クラミドモナス
## a．核ゲノム

福澤　秀哉[1)]，久保　雄昭[1)]

緑藻クラミドモナス *Chlamydomonas reinhardtii* は，核，葉緑体，ミトコンドリアの3つのゲノムすべてについて遺伝子導入が可能となっており，外来遺伝子の導入や遺伝子タギング法による突然変異株の作製も容易になっている[1,2]．本稿では，クラミドモナスの核ゲノムの2種類の形質転換法（エレクトロポレーション法・ガラスビーズ法）を紹介する．

## Nuclear transformation methods for a green algae, *Chlamydomonas reinhardtii*

Hideya Fukuzawa, Takeaki Kubo

The nuclear transformation techniques are powerful tools for isolation of new mutants, and also for complementation of mutant phenotypes by introducing exogenous DNA segments into the nuclear genome. We described two methods for nuclear genome transformation in a green algae, *Chlamydomonas reinhardtii*. Linealized DNA fragments encoding selectable markers can be introduced into the nuclear genome by using electroporation and glass beads. Especially dominant selectable markers are useful for the selection of transformants for gene tagging.

### 2.a.1　クラミドモナスの形質転換

クラミドモナスの核ゲノムの形質転換は，1990年にKindleによって初めてガラスビーズ法による形質転換法が報告されて以来，広く行われるようになった[3–5]．また1998年にはエレクトロポレーション法による高効率の形質転換法も開発され[6]，ガラスビーズ法と共に一般的な形質転換法として利用されている．また栄養要求性変異株を宿主にしたマーカー遺伝子や，選抜マーカーとしての薬剤耐性遺伝子も報告されており，実験の目的に応じたマーカーの選択を行うことが可能になっている（表1）．栄養要求性マーカー（硝酸還元酵素）や薬剤耐性マーカーを使った遺伝子タギング法は新しい遺伝子の発見につながる有用な方法である[7,8]．宿主として用いるクラミドモナスの栄養要求性変異株や野生株，ならびにマーカー遺伝子は開発者もしくは米国のChlamydomonas Center（http://www.chlamy.org/）から入手可能である（第1章-3参照）．

#### 2.a.1.1　エレクトロポレーションによる核ゲノムの形質転換

細胞のDNAによる形質転換には，細胞壁が障害となるので，細胞壁の不完全な変異株を使うことが多い．細胞壁が正常な株を形質転換に使いたい場合は，クラミドモナス由来の細胞壁溶解酵素ガミートライシン（マトリクス・メタロプロテアーゼ）を使って細胞壁を除去して使用する[9]．ただし，完全に細胞壁を失った細胞は物理的に弱いので，使用する株毎に処理条件を検討する必要がある．

［試料］
- pSP124S[注1] 制限酵素EcoRIで切断し，線状DNAにしておく．
- クラミドモナス宿主株CC-2627（5D：*nit1-305*，*cw15*，*mt*$^-$）[注2]

［試薬］
- TAP培地[注3]
- TAP-50 mM Sucrose[注4]

1）京都大学大学院生命科学研究科遺伝子特性学分野

注1　RbcS2プロモーターにコドン適合型ゼオシン耐性遺伝子（*Ble*）を連結させたコンストラクト．http://www.chlamy.org/plasmids.html から入手可能．表1参照．

注2　硝酸還元酵素遺伝子 *NIT1* と細胞壁欠損（*cw*）の変異株．エレクトロポレーション法及び後に述べるガラスビーズ法では，細胞壁合成酵素の変異株を用いることが多いが，この株は，完全に細胞壁を失っているわけではなく，形態は卵形である．

注3　TAP培地の作製法については，第1章-3参照．

注4　浸透圧調整用．

**表1**：クラミドモナ核ゲノムの形質転換に利用できるマーカー遺伝子や薬剤耐性遺伝子

| マーカー遺伝子 | 酵素名 | 宿主株 | 選択培地・抗生物質 | 文献 |
|---|---|---|---|---|
| *NIT1*（*NIA1*） | Nitrate reductase | *nit1*$^-$ 株 | TAP($NO_3$)培地 | 5，10 |
| *THI10* | Hydroxyethylthiazole kinase | *thi10*$^-$ 株 | Thiamin 添加培地 | 11 |
| *ARG7* | Argininosuccinate lyase | *arg7*$^-$ 株 | TAP-アルギニン添加培地 | 12 |
| *BLE* | Zeocin 結合タンパク質 | 野生株 | Zeocin 添加培地 | 13，14 |
| *APHVII* | Aminoglycoside 3′ -phosphotransferase VII | 野生株 | パロモマイシン添加培地 | 15 |
| *APHVIII* | Aminoglycoside 3′ -phosphotransferase VIII | 野生株 | ハイグロマイシン添加培地 | 16 |

・1.2% 選択培地

**[器具・装置]**

・培養用エアインキュベーター
・Gene PulserII（BioRad）
・滅菌済み爪楊枝
・滅菌済み平底 96 穴タイタープレート
・エレクトロポレーション用キュベット（電極間距離 4 mm）

**[方法]**

1）宿主株5Dを，TAP培地1lで26°C，100～150 $\mu$mol·m$^{-2}$·sec$^{-1}$ 光照射下で1～2×10$^6$cells/ml（対数増殖期）まで培養する．
2）培養液を一部採取し，10% glutaraldehyde を 1/10 量添加して細胞を固定し，血球計算板で細胞数を測定する．
3）700×g で 10 分間遠心して集藻し，細胞を 1×10$^8$ cells/ml になるように TAP＋50 mM Sucrose で再懸濁する．
4）形質転換に用いる pSP124S 溶液を 20 $\mu$g 加える．
5）4 mm キュベットに細胞懸濁液 250 $\mu$l を移し，15°C で 5-15 分冷却する．
6）電気パルスを一回加える[注5]．
7）ポレーション処理後の細胞を 15 ml FALCON TUBE に分注した TAP 培地 12 ml に懸濁し，ローテーターで回転させながら 100～150 $\mu$mol·m$^{-2}$·sec$^{-1}$ の光照射下で 16 時間培養する．
8）抗生物質 Zeocin を 10 $\mu$g/ml 含む 1.2% TAP プレートにスプレッダーで均一に広げ，5 分間静かに置いて，細胞を寒天培地になじませる．
9）シャーレを裏返して 100～150 $\mu$mol·m$^{-2}$·sec$^{-1}$ の光照射下，26°Cで培養し，約一週間すると，形質転換体のコロニーが得られる（図 1）[注6]．
10）コロニーを滅菌爪楊枝で拾い，TAP 寒天培地に画線し，1 日培養した後に，0.2 ml の TAP 培地を分注したタイタープレートに移して細胞が生え揃うまで培養する．

### 2.a.1.2 ガラスビーズ法を用いた核ゲノムの形質転換[4)]

**[試料]**

・クラミドモナス宿主株 CC-2627（5D；*nit1-305*，*cw15*，*mt*$^-$）
・プラスミド DNA pMN24E[注7]

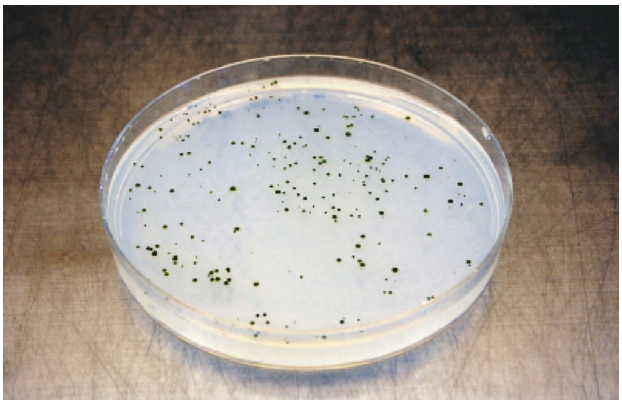


**図1**：エレクトロポレーション法によってゼオシン含有培地上に生育した形質転換体

[注5] ジーンパルサーIIを用いた場合の設定は，キャパシタンス 25 $\mu$F，負荷電圧 2,000 V/cm（＝800 V/4 mm）バイパス抵抗としてセメント抵抗(330 Ω)を電極間に配線する．この条件で時定数は 5.0 程度（4.5～5.5）を示す．

[注6] 約一週間でコロニーが見え始め，2 週間目までの間に 1～2 mm の大きさになる．シャーレの蓋に水滴が付いたままだと，雑菌が混入する可能性があるので，定期的にクリーンベンチ内で除く．

[注7] 硝酸還元酵素遺伝子 *NIT1* 全長を含むプラスミド DNA (pMN24) を *Eco*RI で切断後，フェノール処理・エタノール沈殿して使用する．表 1 参照．

[試薬]
・TAP 培地
・$TAP_{(NO3)}$ 培地[注8]
・20% PEG（6000）溶液（シグマ）[注9]

[器具・装置]
・ボルテックスミキサー VORTEX-GENIE 2（Scientific industries）
・培養用インキュベーター
・滅菌済み平底 96 穴タイタープレート
・直径 0.35〜0.5 mm のガラスビーズ（イウチ）[注10]

[方法]
1）宿主株 CC-2627 を，1 L の TAP 培地中で，26°C，100〜150 $\mu$mol・$m^{-2}$・$sec^{-1}$ 光照射下で 1〜2×$10^6$ cells/ml（対数増殖期）まで培養する．
2）培養液を一部採取し，10% グルタルアルデヒドを 1/10 量添加して細胞を固定し，血球計算板で細胞数を測定する．
3）700×g，20°C，10 分間遠心して集藻し，上清を十分に取り除く[注11]．
3'）細胞壁をもつ株を用いる場合には，ここで集めた細胞をオートライシンを含む酵素液に懸濁して 15〜30 分，光照射しながらゆっくりと振盪して細胞壁を除く[注12]．
4）沈殿した細胞を TAP（$NO_3$）培地で 2×$10^8$cells/ml になるよう再懸濁する．
5）5 ml のガラスビーズを入れた 50 ml 遠沈管に細胞懸濁液を 5 ml 加える．
6）20 $\mu$g の pMN24E プラスミド DNA（濃度 1 $\mu$g/$\mu$l）と，1.66 ml の 20%PEG（6000）溶液を加える．
7）ボルテックスを最高速度にして，30 秒撹拌する．
8）遠沈管の 50 ml の目盛りまで TAP（$NO_3$）培地を加えて細胞をよく懸濁し，ガラスビーズがよく底に沈むよう，遠沈管を立てたまま 10 秒程度静置する．
9）上清を新しい 50 ml 遠沈管に移す．
10）700×g, 20°C, 10 分間遠心して集藻し上清を捨てる．
11）1 ml の TAP（$NO_3$）培地を加えてボルテックスにより細胞を再懸濁する．
12）一枚の TAP（$NO_3$）プレートあたり 0.1–0.5 ml の細胞懸濁液をスプレッダーで均一に広げ，細胞が流れなくなるまで静置する．
13）シャーレを逆さにして 26°C，100〜150 $\mu$mol・$m^{-2}$・$sec^{-1}$ の光照射下，約 10–14 日間静置培養する．
14）コロニーを爪楊枝で拾い，0.2 ml の TAP（$NO_3$）培地を分注したタイタープレートに移して細胞が生え揃うまで培養する[注13]．

[トラブルシューティング]
1．形質転換効率が低い．
主な原因として宿主株の細胞壁が再生している可能性がある．細胞壁の有無の検定を次のように行う．250 $\mu$l の培養液に 0.075% Triton-X，5 mM EDTA を加え，5–10 秒間ボルテックスミキサーで攪拌する．攪拌後の細胞を顕微鏡で観察すると，細胞壁欠損の細胞は破壊されるが，細胞壁が残っていると生細胞が観察される．もし細胞壁が再生していれば株のストックからシングルコロニーをとり，細胞壁の薄いものを選び出す．もしくは，細胞壁溶解酵素を使って細胞壁を除く操作を加える．

2．バクテリアの混入がみられる．
50 $\mu$g/ml のアンピシリンを含む TAP プレートに画線培養し，シングルコロニーを単離し直すとよい．また形質転換の前に少量の LB 培地に細胞懸濁液を加えて一晩 37°C で振とう培養し，バクテリアの混入がないことを確認しておく．

〈謝辞〉 貴重なコメントを頂いた京都大学大学院理学研究科の西村芳樹先生に感謝します．

## 参考文献

1）福澤秀哉・九町健一・三浦謙治：植物のゲノム研究プロ

[注8] TAP 培地の塩ストック液の $NH_4Cl$ を $KNO_3$ で置き換えたもの．
[注9] 脱イオン水に溶解し，120°C で 15 分間オートクレーブ後，遮光して室温で保存する．
[注10] 濃硫酸に 30 分ほど沈め，その後十分な流水で硫酸を除く．さらに 180°C で 3 時間乾熱滅菌処理してから，滅菌済み 50 ml 遠沈管に 5 ml づつ分注しておく．
[注11] 培地中に含まれるアンモニア塩が残ると，形質転換株の選抜時宿主株も生育してしまうので，滅菌済マイクロピペットを用いて可能な限り除去する．
[注12] 野生株の雌雄配偶子を高効率で接合させ，30 分後の細胞液を遠心した上清液をガミトライシンの粗酵素液として利用する．−80°C で 3 ヶ月程度は保存が可能である．
[注13] 筆者らの研究室では，透明アクリル製のデシケータに，三角フラスコに入った水をくぐらせた 1 %$CO_2$ ガスを含む空気を通気して培養している．ガスを水中に通すことでチャンバー内の湿度を高く保つことができ，培地の乾燥を防ぐことができる．また光合成に必要な $CO_2$ ガスを供給することにより増殖速度が上昇する．

トコール（佐々木卓治・田畑哲之・島本　功監修），pp.169–178，秀潤社（2001）．
2）福澤秀哉，久保雄昭，山野隆志，蛋白質核酸酵素（共立出版）Vol.53（9）（2008）P.1133．
3）K. L. Kindle, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **87** (1990) P. 1228.
4）H. Fukuzawa, K. Ishizaki, K. Miura, S. Matsueda, T. Ino-ue, K. Kucho, & K. Ohyama, Can. J. Bot. **76** (1998) P. 1092.
5）K. Kucho, S. Yoshioka, F. Taniguchi, K. Ohyama, H. & Fukuzawa, Plant Physiol. **133** (2003) P.783.
6）K. Shimogawara, S. Fujiwara, A. Grossman, H. & Usuda, Genetics **148** (1998) P.1821.
7）H. Fukuzawa, K. Miura, K. Ishizaki, K. Kucho, T. Saito, T. Kohinata, & K. Ohyama, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **98** (2001) P.5347.
8）T. Matsuo, K. Okamoto, K. Onai, Y. Niwa, & K. Shimogawara, M. Ishiura, Genes Dev. **22** (2008) P.918.
9）Y. Matsuda, & T. Kubo, Gametolysin. *In* Handbook of Proteolytic Enzymes 2nd ed. Academic Press. (2004) P. 1140.
10）K. L. Kindle, R. A. Schnell, E. Fernandez, & P. A. Lefebvre, J. Cell Biol. **109** (1989) P.2589.
11）P. J. Ferris, Genetics **141** (1995) P.543.
12）R. Debuchy, S. Purton, & J. D. Rochaix, EMBO J. 8 (1996) P.1432.
13）D. R. Stevens, S. Purton, & J. D. Rochaix, Mol. Gen. Genet. **251** (1996) P.245.
14）V. Lambreras, D. R. Stevens & S. Purton, Plant J. **14** (1998) P.1441.
15）P. Berthold, R. Schmitt, & W. Mages, Protist **153** (2002) P.401.
16）I. Sizoba, M. Fuhrman, & P. Hegemann, Gene **277** (2001) P.221.

# 2．クラミドモナス
## b．葉緑体ゲノムの形質転換

皆川　　純[1)]

1989年に行われた最初の葉緑体形質転換では単細胞緑藻のクラミドモナスが使われた．その後，形質転換の手法には工夫が重ねられ，またいくつもの選択マーカー，発現マーカーが開発された．クラミドモナス葉緑体形質転換の歴史的背景と現状を解説する．また，最新のツールとプロトコルを紹介する．

# Transformation of chloroplast genome - *Chlamydomonas reinhardtii*

Jun Minagawa

Stable chloroplast transformation was first accomplished by *Chlamydomonas reinhardtii* bombardment with high-velocity microprojectiles in 1989. Transformation techniques have been refined, and several selectable markers and reporter genes have been developed. This chapter overviews the history and current situation of chloroplast transformation of *C. reinhardtii*, including the molecular tools and the standard protocols.

### 2.b.1　背景

多くの高等植物の細胞では細胞あたり100から1000個の葉緑体があるとされるが，クラミドモナスには細胞あたり1個しか存在せず，しかも細胞容量の40-60%を占めるほど細胞内にひろがっている．大きな葉緑体が1個しかないという特長が，クラミドモナスが葉緑体形質転換生物の一番手となる決め手となった．クラミドモナスの葉緑体ゲノムは環状分子で配列は決定されており，そのサイズは203 kbpである[1)]．葉緑体タンパク質の多くは核ゲノムにコードされているが，光化学系IのPsaA/Bタンパク質や光化学系IIのD1/D2タンパク質など，光合成系の主要なタンパク質は葉緑体ゲノムにコードされている．これらのタンパク質の構造や機能を解析するうえで，葉緑体形質転換系は重要な研究手段となっている[2)]．また，最近では葉緑体工場の名のもと，ヒト抗体ほか有用なタンパク質の発現が次々と試みられている[3)]．

### 2.b.2　バイオリスティック形質転換

葉緑体遺伝子の発現系は原核生物型であり，導入されたDNAは核ゲノムの場合と異なり相同組換えにより葉緑体ゲノムに組み込まれる．したがって，ジーンターゲッティングが可能である．しかし，葉緑体は堅い細胞壁をもつ植物細胞の中にあるだけでなく，二重の包膜に包まれているため，葉緑体のストロマに目的のDNAを導入することは容易ではなかった．

葉緑体形質転換系の開発における最も重要な突破口は，BoyntonらとSanfordのグループによって1988年に報告されたクラミドモナスの研究である[4)]．彼らは，*atpB*遺伝子を欠損し光合成的に生育できない変異株をホストに用い，野生型の*atpB*遺伝子をパーティクルガンで葉緑体に導入し，形質転換体が光独立栄養条件で生育することを証明してみせたのだ．これに先立つ1984年，植物体の形質転換のために花粉へ遺伝子を導入しようとしていたSanfordは，既存の導入法を試みたがどれもうまくいかず，高エネルギーイオンビームを打ち込んで細胞に穴を開けてみようと，極微細加工の専門家Wolfのもとを訪れた．この試みもうまくはいかなかったが，逆にDNAの方を打ち込んではどうかとすすめられ，以後3年をかけてDNAを細胞に打ち込む技術を確立したことになる．彼らによって，硬い細胞壁を通過させるためには，1）柔らかいDNAを硬い粒子に付着したさせればよいこと，2）貫通した硬い粒子は必ずしも細胞に死をもたらすわけではないこと，3）小さな細胞には小さな粒子が有効であること，4）粒子を減速させないためには真空中で打ち込みを行うと良いことなどが明らかにされた．更に，5）細胞内に粒子を打ち込むには，〝銃〟と同様の原理で行うと最も効果があることもわかり，装置をパーティクルガン（粒子銃）と名付け，それによる形質転換をバイオリスティック形質転換[注1]と呼ぶことにした[5)]．

1）北海道大学低温科学研究所

## 2.b.3　分子生物学的ツール

初期の研究では，抗生物質耐性を示すリボソームRNA遺伝子上の点変異を選択マーカーとして用いた[6]．この場合，別のプラスミド上にコードされた目的の導入遺伝子はリボソームRNAマーカー遺伝子と同時に葉緑体に導入される（co-transformation）．しかしこの方法はマーカーのみが導入される確率が高いため，現在ではその後に開発された以下のマーカーが広く使われるようになった．

### 2.b.3.1　薬剤選択マーカー*aadA* カセット

Goldschmidt-Clermont[7]によって開発された細菌由来のスペクチノマイシン／ストレプトマイシン不活化酵素（aminoglycoside adenine transferase）遺伝子（*aadA*）．5’側にクラミドモナス葉緑体由来の*atpA*遺伝子の5’UTRを，3’側に*rbcL*遺伝子の3’UTRをそれぞれ連結したものが配布されている．*aadA*カセットは葉緑体ゲノム上どこに挿入させることも可能であるが，*aadA*カセット挿入サイトの上流または下流に存在する遺伝子の発現に影響を与える可能性に留意しなければならない．

### 2.b.3.2　再利用可能な薬剤選択マーカー 483-AAD-483 カセット

*aadA*遺伝子をマーカーとして同一株に複数回の遺伝子導入を行うために開発された[8]．*aadA*カセットの前後に全く同じ配列を持つ483 bpのDNAを連結させたため，その部分で起こる相同組み替えを利用してマーカーをゲノムから排除する（マーカーを失った株を選択する）ことが可能となった．工程としては，一旦選択培地上でスペクチノマイシン耐性をマーカーとしてカセットをゲノム上に組み込ませたのち，スペクチノマイシンを加えない培地に移し薬剤による選択圧を取り除く．前後の483 bp配列同士の間で組換えが起き，中心の*aadA*部位が抜け落ちたスペクチノマイシン感受性株を選抜する．導入した部位特異的変異や483 bp配列はゲノムの挿入部に残るが，スペクチノマイシンには再び感受性となる．こうして，部位特異的変異の導入や遺伝子破壊をさらに加えられるようになった．この方法により，葉緑体ゲノム上の遺伝子操作は何度でも行うことができる．

### 2.b.3.3　薬剤選択マーカー*aphA-6*

*aadA*以後報告されたいくつもの薬剤選択マーカーのうち，Bateman and Purton[9]によって開発された院内感染菌*Acinetobacter baumannii*のaminoglycoside phosphotransferase遺伝子（*aphA-6*）は，安定したカナマイシン（もしくはアミカシン）耐性遺伝子として広く使われている．

### 2.b.3.4　レポーター遺伝子

葉緑体ゲノム遺伝子の発現レポーター遺伝子としては，複数のGFPやルシフェラーゼなどが報告されている（表1）．高い発現を得るため，ほとんどの場合クラミドモナス葉緑体ゲノム用にコドンバイアスが最適化されている．詳細は原報を参照されたい．

## 2.b.4　葉緑体形質転換の手順

### 2.b.4.1　ベクターの作成

ゲノムに挿入する遺伝子の両端に，十分長い葉緑体ゲノム配列を配置した形質転換ベクターを作成する．相同組換え（double crossover event）を効率良く起こすためである．長さは少なくとも500 bp程度は必要で，通常は1 kb以上を用いる．

### 2.b.4.2　パーティクルガンによる遺伝子導入

ベクターDNAをマイクロキャリアと呼ばれる微小なタングステンもしくは金粒子（直径約1 $\mu$m）に付着させ，これを音速程度に加速させプレート上の細胞に撃ち込む．初めて市販されたパーティクルガンは火薬を使ったものであったが（PDS-1000，デュポン），その後ガス式の銃が考案された[16]．この方式では，DNAを付着させた

**表1**：クラミドモナスで利用されるレポーター遺伝子

| レポーター遺伝子 | 発現されるレポーター | 文献 |
|---|---|---|
| *uidA* | 大腸菌（*E.coli*）GUS（$\beta$-glucoronidase） | 10） |
| *gfp* | クラゲ（*Aequora victoria*）GFP | 11） |
| *GFPct* | クラゲ（*Aequora victoria*）GFP | 12） |
| *rluc* | ウミシイタケ（*Renilla reniformis*）ルシフェラーゼ | 13） |
| *luxCt* | 発光細菌（*Vibrio harveyi*）ルシフェラーゼ | 14） |
| *lucCP* | ホタル（*Photinus pyralis*）ルシフェラーゼ | 15） |

註1 〝バイオリスティック（biolistic）〟は，生物学的弾道学（biological ballistics）を意味する造語．

マイクロキャリアの懸濁液をさらにマクロキャリア（銃で例えれば銃弾に相当する）に付着させる．真空室の天井にマクロキャリアを〝装塡〟した後，ヘリウムガスをラプチャーディスクが破れるまで圧縮し，破れた瞬間の圧力でマクロキャリアをストッピングスクリーンに打ち付ける．マイクロキャリアは慣性の法則で細胞に打ち込まれる．マイクロキャリアの大きさはクラミドモナスの十分の一程度なので，‘爆撃’を受けた大半の細胞は，‘絶命’する運命となるが，中には1個程度の‘貫通銃創’を負っても，生命には別状のないものもある．このような細胞では，マイクロキャリアが貫通した際にその表面に付着していた遺伝子が細胞内に残されていることがある．残された遺伝子と葉緑体ゲノム上の遺伝子との間で相同的組換えが行われると，組換え遺伝子が葉緑体ゲノム上に保持される．

#### 2.b.4.3　形質転換体の選択

‘爆撃’後，選択培地上の細胞はゆっくりと死に，緑の色が薄くなりわずかに褐色を帯びてくる．選択マーカーに *aadA* カセットを用いた場合，暗所よりわずかに光が当たる場所に放置したほうが選択マーカーがよく発現する．1−3週間程度で，死んだ細胞の層上に緑の濃いコロニーが現れる（図1）．葉緑体には80コピーのゲノムが含まれるので，最初に生育してきたコロニーでは葉緑体ゲノムが形質転換型になっているわけではなく，野生型のコピーも残る．そこで，得られたコロニーを新しい選択培地のプレートで1週間程度生育させシングルコロニーを単離する．これを3回程度繰り返すことによって，葉緑体ゲノムのすべてのコピーは完全に形質転換型に変換される．



**図1**：爆撃後2週間たった選択培地上にはこのようにコロニーが現れる．

## 2.b.5　葉緑体形質転換プロトコル

#### 2.b.5.1　用意するもの

**［パーティクルガン］**

現在日本で入手可能な2機種と自作の方法について紹介する．

1．PDS-1000/He（Bio-Rad 165-2431，定価540万円）

初期の火薬式のPDS-1000に替え，ヘリウムガス用に改良されたもの．ラプチャーディスクやマクロキャリアを必要とするなどPDS-1000時代からのシステムをそのまま引き継いでいる．文献に良く登場するのが利点であるが，装置自体が高価であり，またランニングコストも安価ではない．

2．PIG（自作）

PDS-1000/Heで必要となるラプチャーディスクやマクロキャリアは使わず，ヘリウムガスボンベを電磁弁で制御することでマイクロキャリアを発射する．このためパーティクル〝インフロー〟ガン（PIG）と呼ばれる[17]．リレーを用いた簡単な回路によって制御する電磁弁，天井部にフィルターホルダーを取り付けられるようにデザインした真空室，ヘリウムボンベ，真空ポンプとそれに配管部品等を組み合わせて比較的安価に自作することができる（図2，3）．ランニングコストもほとんどかからず，またPDS-1000/Heよりも10倍

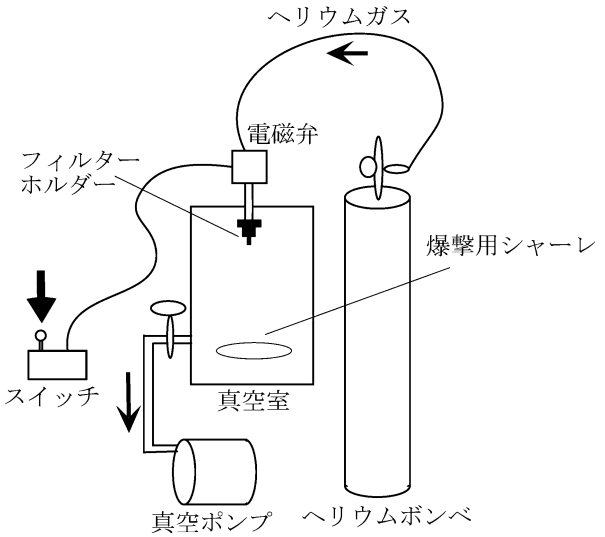



**図2**：パーティクル・インフロー・ガンの構成

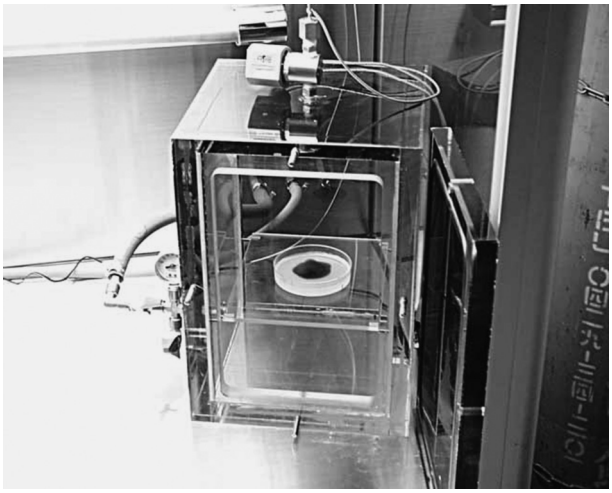


図3：自作したパーティクル・インフロー・ガン

から100倍効率が良いとの報告もある．電磁弁制御の方がヘリウムガスを正確にコントロールでき，特に低圧で発射することが可能であるために，サンプルに優しい爆撃ができるためであると考えられている．

3．IDERA GIE-III（株式会社タナカ，定価228万円）PIGの原理を用いて商品化した国産品．

### [マイクロキャリア]

バイオリスティック形質転換では，タングステン粒子あるいは金粒子がマイクロキャリアとして使われる．タングステンは安価でさまざまな粒子径のものが手に入り，DNAもよく結合するが，粒子径の分布が荒い，生物学的に有害であるなどの欠点を持つ．金粒子は均一な粒子径のものが手に入る反面，DNAを結合させにくく，また凝集したりプラスチックの表面に付着するなど取り扱いが難しい．クラミドモナスの葉緑体形質転換においては，ほとんどの研究者がタングステンを使用している．Sanford[18]によるとマイクロキャリアの粒子径は細胞の大きさの十分の一程度が目安となるため，長径が5〜10 $\mu$mであるクラミドモナスに対しては，通常は1 $\mu$m径程度のものが選択される．国内で容易に入手できる2種を紹介する．

1．タングステンM17（$\phi$1.1 $\mu$m）(Bio-Rad，#165-2267)

2．B10（$\phi$1-1.3 $\mu$m）（東京タングステン株式会社）

## 2.b.5.2　プロトコル

以下のプロトコルは，Boynton et al.（1988）を改変したものである．

1．2 x $10^6$ cells/ml程度に生育したホスト株40 mlを遠心して集める．

2．細胞を0.5 ml程度のTAP培地に懸濁し，あらかじめよく乾かしたTAP培地の中央に直径5 cm程度の‘水溜り’を作る．クリーンベンチで2-3時間乾かす．

3．タングステン粒子約50 mgをエッペンドルフチューブに量りとる．

4．エタノールを1 ml加え，30秒間ボルテックスして滅菌する．

5．微量遠心機で遠心してタングステンを沈殿させ，上清のエタノールを捨てる．

6．タングステン粒子を滅菌水0.5 mlに再懸濁し，30秒間ボルテックスののち，再度遠心し，上清を捨てる．

7．6．をもう一度繰り返す．

8．100 mg/mlになるようタングステン粒子を25% glycerol溶液に懸濁する．

9．以下の順で必要な試薬をマイクロチューブに加える．一つ加えるごとにピペッティングでよく混合する．

| | |
|---|---|
| 滅菌水 | 7.5 $\mu$l |
| 100 mg/ml　タングステン懸濁液 | 7.5 $\mu$l |
| 0.3 mg/ml DNA溶液[a] | 5 $\mu$l |
| 2.5 M $CaCl_2$ | 12 $\mu$l |
| 0.48 M Spermidine | 1 $\mu$l |

[a]DNAはMini-prep程度の純度の環状プラスミドで良い．

10．室温で10分間静置する．

11．微量遠心機で30秒間遠心し，上清のうち25 $\mu$lを捨てる．

12．エッペンドルフチューブの底に沈殿したタングステンの粒子を残りの8 $\mu$lの溶液にピペッティングでよく懸濁したのち，シリンジホルダー内の金属メッシュの中央に注意深くのせる．

13．真空チェンバーの空気流入弁を閉じ，真空ポンプへの弁を開け，真空ポンプを起動する．

14．真空ゲージが25 inch Hgを指した時点で真空ポンプへの弁を閉じる．

15．ヘリウムガス（6 kg/$cm^2$）の電磁弁を50ミリ秒間開放することによってタングステン粒子をプレート上の細胞層に打ち込む．

16．室温，弱光のもとで3時間程度静置したのち約5 mlのTAP培地で細胞層を剝ぎ取り，懸濁した上で，選択培地（通常は100 $\mu$g/mlスペクチノマイシンを添加したTAP培地）上にスプレッドする．

17．10日前後で現れるコロニーを，白金耳で8個程度単離する．

18．更に約10日後，成長した単離コロニーから葉緑体

DNA を Mini-prep（後述のプロトコル参照）する．

19．適当なプライマーを用いて PCR を行ったのち，該当領域の塩基配列を決定する．

※必要ならばホモプラスミック状態が得られるまで，スプレッド→単離→塩基配列解析を繰り返す．

## 2.b.6 クラミドモナス葉緑体 DNA の Mini-prep プロトコル

大腸菌からプラスミド DNA を抽出する手法をほぼそのまま踏襲する．キアゲン社の QIAquick plasmid mini-prep kit を用いて行う例を紹介するが，陰イオン交換カラムがなければフェノール処理等でも実用上問題はない．

1．2 週間程度培養した TAP 培地上から，白金耳の先のループに載る程度のコロニーをすくい取る．

2．エッペンドルフチューブにあらかじめ 0.25 ml の P1 溶液（50 mM Tris. HCl，10 mM EDTA，1 mg/ml RNaseA，pH 8.0）を入れておき，1 ですくったコロニーをそこに懸濁する．よく懸濁しにくい場合は適宜超音波処理等を行う．

3．P2 溶液（0.2 M NaOH，1 %SDS）を 0.25 ml 加え，細胞を可溶化する．

4．N3 溶液（主成分酢酸）を 0.35 ml 加え，数秒ボルテックスによって攪拌する．

5．12000 rpm，5 分間遠心する．

6．上清を付属の陰イオン交換カラムにロードし，12000 rpm，1 分間遠心する．

7．リザーバーに受けたフロースルーを捨て，以下，0.5 ml PB 溶液，0.75 ml の PE 溶液の順でカラムを洗浄する．

8．3 分間 12000 rpm で遠心し，カラム上のメンブレンを乾かしたのち，30 μl の精製水で 1 分間インキュベーションすることにより DNA を抽出する．これらの DNA は制限酵素処理，PCR 等にそのまま使える．

## 参考文献


1）J. E. Maul, J. W. Lilly, L. Cui, C. W. dePamphilis, W. Miller, E. H. Harris, & D. Stern, Plant Cell **14** (2002) P. 2659.

2）L. Xiong, & R. T. Sayre, Photosynth. Res. **80** (2004) P. 411.

3）S. P. Mayfield, A. L. Manuell, S. Chen, J. Wu, M. Tran, D. Siefker, M. Muto, & J. Marin-Navarro, Curr. Opin. Biotechnol. **18** (2007) P.126.

4）J. E. Boynton, N. Gillham, E. H. Harris, J. P. Hosler, A. M. Johnson, A. R. Jones, B. L. Randolph-Anderson, D. Robertson, T. M. Klein, K. B. Shark, & J. C. Sanford, Science **240** (1988) P.1534.

5）J. C. Sanford, Trends Biotechnol. **6** (1988) P.299. ※バイオリスティック形質転換発明のいきさつが書かれている．

6）S. M. Newman, N. W. Gillham, E. H. Harris, A. M. Johnson, & J. E. Boynton, Mol. Gen. Genet. **230** (1991) P.65.

7）M. Goldschmidt-Clermont, Nucl. Acids Res. **19** (1991) P.4083.

8）N. Fischer, O. Stampacchi, K. Redding, & J. -D. Rochaix, Mol. Gen. Genet, **251** (1996) P.373.

9）J. M. Bateman, & S. Purton, S., Mol. Gen. Genet. **263** (2000) P.404.

10）W. Sakamoto, K. L. Kindle, & D. B. Stern, D. B. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **90** (1993) P.497.

11）Y. Komine, E. Kikis, G. Schuster, & D. Stern, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **99** (2002) P.4085.

12）S. Franklin, B. Ngo, E. Efuet, & S. P. Mayfield, Plant J. **30** (2002) P.733.

13）I. Minko, S. P. Holloway, S. Nikaido, M. Carter, O. W. Odom, C. H. Johnson, & D. L. Herrin, Mol. Gen. Genet. **262** (1999) P.421.

14）S. P. Mayfield, & J. Schultz, Plant J. **37** (2004) P.449.

15）T. Matsuo, K. Onai, K. Okamoto, J. Minagawa, & M. Ishiura, Mol. Cell Biol. **26** (2006) P.863.

16）J. C. Sanford, M. J. Devit, J. A. Russell, J. F. D. Smith, P. R. Harpending, M. K. Roy, & S. A. Johnston, Technique **3** (1991) P.3.

17）J. J. Finer, P. Vain, M. W. Jones, & M. D. McMullen, Plant Cell Rep. **11** (1992) P.323.

18）J. C. Sanford, F. D. Smith, & J. A. Russell, Methods in Enzymolgy **217** (1993) P.483. ※バイオリスティック形質転換の応用についてまとめるとともに，最適化へのヒントを数多く含む．

# 3．ゼニゴケ
## a．アグロバクテリウムによるゼニゴケ核ゲノム形質転換法

石崎　公庸[1)]，河内　孝之[1)]

苔類ゼニゴケは，アグロバクテリウムを介する形質転換が容易である．胞子から培養した分化初期の葉状体を使うことによって，1胞子嚢あたり数百の独立した形質転換体が短期間で作成できる．世代の大半が半数体であることや無性芽による純系化といった特徴を生かしたユニークな実験が可能となった．

## *Agrobacterium*-mediated transformation of the liverwort *Marchantia polymorpha* L.

Kimitsune Ishizaki, Takayuki Kohchi

Here we describe a rapid *Agrobacterium*-mediated transformation protocol for the liverwort, *Marchantia polymorpha* L. using immature thalli developed from spores. This protocol should provide molecular techniques to facilitate comparative genomics, taking advantage of this unique model plant that retains many features of the common ancestor of land plants.

### 3.a.1　概論

苔類ゼニゴケは，他の多くの植物同様に，パーティクルガンによるDNAの直接導入法により形質転換が可能である[1,2)]．しかし，挿入コピー数が多く染色体の再編成を伴う傾向があることや，導入したDNAが断片化すること等の問題があった．アグロバクテリウムによる形質転換は，一般的に，パーティクルガンやポリエチレングリコール（PEG）などを用いたDNA直接導入法と比べ，操作が簡便であること，形質転換効率が高いこと，挿入コピー数が比較的低いことなど多くの利点がある[3)]．ゼニゴケにおいても，アグロバクテリウムによる形質転換法が幾度か試されたが，無性芽および無性芽から生育させた葉状体を用いた場合，形質転換効率は低く実用的ではなかった．近年，蛍光灯に加え遠赤色光を照射することにより，成熟した葉状体を生殖成長へと移行させることに成功し，実験室条件下で胞子を大量に採取できるようになった（1.4．大和らの項参照）．この胞子より短期間培養した分裂の盛んな分化初期の葉状体（以降，幼葉状体と呼ぶ）をアグロバクテリウムと共培養することにより，1胞子嚢あたり数百ラインという高い形質転換効率が得られた[4)]．この際，胞子発芽後5～7日目の幼葉状体を用いることが重要である．また，もう一つのポイントとして共培養時にアセトシリンゴンを加えることが挙げられる[4)]．この方法で得られた形質転換体には，核ゲノムへのランダムなT-DNA挿入が検出され，その挿入コピー数は1～数コピーであった[4)]．共培養の期間を長くすることで得られる形質転換体が増える傾向が認められたが，単一コピーのものを多く得るには，24～48時間の共培養が推奨される．T-DNAは，その内部で断片化することなくゲノム中に挿入されており，高等植物と同様に，境界配列（ライトボーダー，レフトボーダー）に依存してDNAの組換えが起こっていた[4)]．このことから，苔類ゼニゴケにおけるアグロバクテリウムを介するT-DNA挿入メカニズムは，高等植物の場合と同じであると考えられる[4)]．アグロバクテリウムによるゼニゴケ形質転換は，胞子培養開始から4週間程度で形質転換体の分離が可能である．1細胞に由来する無性芽[5,6)]を単離して培養することにより，純系が容易に分離できる．また，形質転換に供する幼葉状体は，半数体であるため，導入遺伝子の分離（ホモ接合体やヘテロ接合体）を考慮する必要がない．そのため，形質転換直後より，T-DNA挿入による遺伝子破壊の表現型が観察される．このように，ゼニゴケのアグロバクテリウムを介する核DNAの形質転換は，個々の遺伝子機能の解析に加えて，遺伝子タギングによるT-DNA挿入変異株の作製など，様々な展開が期待される．

1）京都大学大学院　生命科学研究科　遺伝子特性学分野

## 3.a.2　形質転換方法

### 3.a.2.1　準備

[試薬・培地]

・ゼニゴケ胞子嚢(表面滅菌済み，1.4. 大和らの項参照)
・2×胞子滅菌液：0.4% アンチホルミン溶液（ナカライテスク，次亜塩素酸ナトリウム溶液を100%として計算する）0.2% Triton® X-100（ナカライ）
・ハイグロマイシン-B（和光純薬）
・セフォタキシム（商品名クラフォラン：Sanofi-Aventis K. K.）
・LB培地（アグロバクテリウム培養用）
・リファンピシン（ナカライテスク）
・アセトシリンゴン：3', 5'-Dimethoxy-4'-hydroxy-acetophenone，100 mM ストック＝19.2 mg/ml in DMSO
・液体培地　0M51C培地（1.4. 大和らの項参照）
・選抜寒天培地　0M51C固体培地（1.4. 大和らの項参照）にハイグロマイシン(終濃度10 μg/ml)，セフォタキシム（終濃度100 μg/ml）を加える．

[器具・装置]

・幼葉状体を回収・洗浄するための器具：6 cm×6 cmの大きさに切断した50 μm格子ナイロンメッシュ（NBC Inc. N-No. 305T)，50 mlプラスチックコニカルチューブを切断し，蓋にドリルで穴をあけたものを組み立てる（図1参照)．
・培養容器：100 ml三角フラスコにシリコ栓をする




図1：ゼニゴケ幼葉状体の回収洗浄用器具
切断した50 mlプラスチックコニカルチューブ，穴を開けた蓋と6×6 cmに切った50 μm格子ナイロンメンブレンを，右にあるように組み立てる．

・ピンセット（歯科用：先が折れているタイプ）

[バイナリーベクターおよびアグロバクテリウム宿主株]

・ハイグロマイシンフォスフォトランスフェラーゼ遺伝子（*hpt*）をマーカーに持つバイナリーベクター．カリフラワーモザイクウィルス35Sプロモータ（CaMV35S）制御であることが望ましい．ノパリンシンターゼ遺伝子のプロモータ（nosP）制御では，ゼニゴケでの発現が弱く，得られる形質転換体の数が，顕著に減少する．使用実績のあるバイナリーベクター例として，pUC由来のマルチクーニングサイトを持つpCAMBIA1300（http://www.cambia.org/daisy/cambia/585.html)や，Invitrogen社のGATEWAY® cloning技術が使用可能なpGWBシリーズが挙げられる[7]．
・アグロバクテリウム宿主株：菌株の検討はしていない．著者らは，通常，シロイヌナズナで用いているC58C1 GV2260（pGV2260)[8]を使用している．他のアグロバクテリウム宿主株，例えばEHA101なども実績がある．

### 3.a.2.2　ゼニゴケ胞子からの植物体培養

[実験方法]

1．胞子嚢が入った1.5 mlマイクロチューブに，滅菌水（1胞子嚢：約$10^5$個の胞子あたり100 μl）を加える．チップの先で1.5 mlマイクロチューブの壁に押し当てるなどして胞子嚢を破り，胞子を懸濁する．
2．懸濁後，胞子嚢の空袋などのゴミを吸わないように注意して，胞子懸濁液を別の1.5 mlマイクロチューブへ移す（図2 A)．
3．（オプション）コンタミネーションが心配な場合は，等量の2×胞子滅菌液で2分間処理し，8,000 × g 1分間の遠心後，滅菌水へ懸濁し，再滅菌する．
4．胞子懸濁液100 μl（1胞子嚢分）を25 mlの0M51C培地（100 ml三角フラスコ）へ加える（図2 B)．
5．130 rpm，22°C，50〜60 μmol photons $m^{-2}s^{-1}$の白色光連続照射下で7日間振盪培養する（図2 C)．

### 3.a.2.3　アグロバクテリウムの準備

[実験方法]

1．バイナリーベクターを形質転換したアグロバクテリウムの培養プレートからシングルコロニーを突き，5 mlの液体LB培地へと植菌し，28°C，2日間培養する．アグロバクテリウムは，2日間でほぼ飽和培養となる．LB培地には使用するベクターに適切な抗生物質とアグロバクテリウム選抜に100 μg/mlリファンピシンを加えておく．

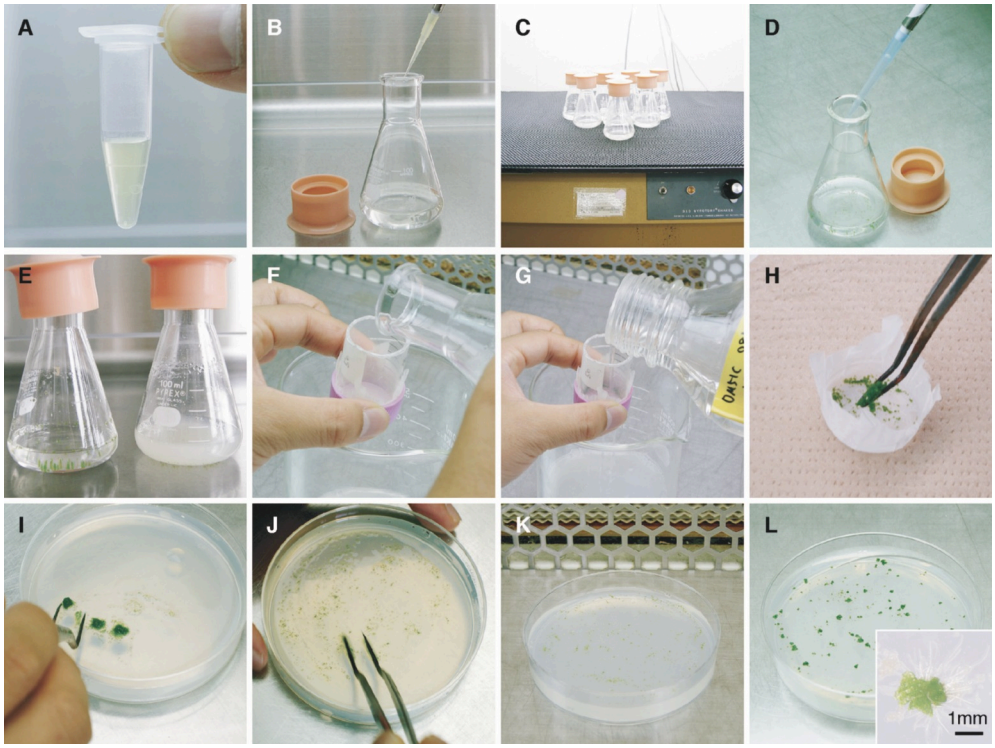



**図2**：アグロバクテリウムによるゼニゴケ核ゲノム形質転換の手順
A）懸濁した胞子．B）0M51C 液体培地への胞子植え付け．C）胞子振盪培養．D）アグロバクテリウムの投入．E）共培養前（左）と共培養終了後（右）．F）共培養液からの幼葉状体の回収．G）0M51C 培地による洗浄．H）ナイロンメッシュからの幼葉状体の回収．I）選抜寒天培地上での幼葉状体の分配．J）選抜寒天培地上に播かれた幼葉状体．K）クリーンベンチ上で余分な水分を飛ばしている様子．L）選抜寒天培地移行後2週間目の様子．右下は拡大図．

2．アグロバクテリウム培養液1 ml を15 ml プラスチックコニカルチューブへ移し，2,000 × g，15 分間遠心し，集菌する．
3．培地を捨て，5 ml の液体 0M51C 液体培地（100 μM アセトシリンゴン含有）を加え，菌体を懸濁する．この時の濁度は $OD_{600}$ ＝1〜2 である．
4．28℃，6 時間，振盪培養する．

### 3.a.2.4　アグロバクテリウムとゼニゴケ幼葉状体の共培養

[実験方法]

1．上記 2.1 で調製した 7 日目のゼニゴケ幼葉状体の培養液 25 ml に対し，2.2 で調製したアグロバクテリウム懸濁液を 1 ml 加える（図 2 D）．
2．終濃度 100 μM となるように，25 μl のアセトシリンゴンを加える．
3．130 rpm，22℃，50〜60 μmol photons $m^{-2}s^{-1}$ の白色光連続照射下で 24〜48 時間，共培養する（図 2 E）．

### 3.a.2.5　形質転換体の選抜

[実験方法]

1．アグロバクテリウムと共培養したゼニゴケ幼葉状体を，図 1 にあるような道具を用いて，50 μm 格子ナイロンメッシュ上に回収する（図 2 F）．
2．約 20 ml の 0M51C 液体培地で 3 回洗う（図 2 G）．
3．ピンセットでゼニゴケ植物体を回収し，約 100 μl の滅菌水を滴下した選抜寒天培地へ移す（図 2 H）．
4．ゼニゴケ幼葉状体を目分量で 3 〜 5 等分し，それぞれ選抜寒天培地へ移す（図 2 I）．
5．ゼニゴケ幼葉状体に 1 mg/ml のセフォタキシム溶液を 1 ml 滴下し，ピンセットで選抜寒天培地上に広げる（図 2 J）．
6．クリーンベンチ上で十分に余計な水分を蒸発させる（図 2 K）．
7．22℃，50〜60 μmol photons $m^{-2}s^{-1}$ の白色光連続照射下で静置培養する．1 〜 2 週間ほどで，仮根の生えた形質転換体が確認できる（図 2 L）．
8．さらに約 2 週間培養すると，杯状体上に無性芽を生ずる個体が出現し始める．無性芽もしくは葉状体の 1 部を新たな選抜寒天培地に植え継ぐ．ゼニゴケの無性芽は 1 細胞由来である[5,6] ので，1 無性芽由来の個体を分離すれば，純系が確立できる．

## 参考文献


1）M. Takenaka, S. Yamaoka, T. Hanajiri, Y. Shimizu-Ueda, K. T. Yamato, H. Fukuzawa, & K. Ohyama, Transgenic Res. **9** (2000) P.179.

2）S. Chiyoda, K. Ishizaki, H. Kataoka, K. T. Yamato, & T. Kohchi, Plant Cell Rep. **27** (2008) P.1467.

3）A. Kohli, R. M. Twyman, R. Abranches, E. Wegel, E. Stoger, & P. Christou, Plant Mol. Biol. **52** (2003) P.247.

4）K. Ishizaki, S. Chiyoda, K. T. Yamato, & T. Kohchi, Plant Cell Physiol. **49** (2008) P.1084.

5）C. R. Barnes, & W. J. G. Land, Bot. Gaz. **46** (1908) P. 404.

6）S. J. Hughes, Can. J. Bot. **49** (1971) P.1319.

7）T. Nakagawa, T. Kurose, T. Hino, K. Tanaka, M. Kawamukai, Y. Niwa, K. Toyooka, K. Matsuoka, T. Jinbo, & T. Kimura, J. Biosci. Bioeng. **104** (2007) P.34.

8）R. Deblaere, B. Bytebier, H. DeGreve, F. Deboeck, J. Schell, M. Van Montagu, & J. Leemans, Nucleic Acids Res. **13** (1985) P.4777.

# 3．ゼニゴケ
## b．ゼニゴケの培養細胞と植物体のプラスチド形質転換法

千代田将大[1)]，河内　孝之[1)]

苔類ゼニゴケは，増殖の盛んな培養細胞や分化初期の葉状体を材料として，容易にプラスチド DNA への遺伝子導入が可能である．スクロースを除いた選抜培地や直線状化したコンストラクト DNA を用いることによって，プラスチド形質転換体獲得の効率が上昇し，ホモプラストーミックな状態にすることも容易となる．

## Plastid transformation system for suspension-culture cells and intact plants of liverwort *Marchantia polymorpha* L.

Shota Chiyoda, Takayuki Kohchi

We describe a simple and efficient plastid transformation method for suspension-culture cells and plants of the liverwort, *Marchantia polymorpha* L.　Selection on a sucrose-free medium improved the recovery rates of plastid transformants.　Homoplastomic transformants were established without the processes of dedifferentiation and regeneration.

### 3.b.1　序論

苔類ゼニゴケのプラスチド DNA（ptDNA）は，緑色培養細胞系を材料として全塩基配列が解読された[1)]．全長が 121,025 bp の環状分子であり，高等植物との間で高度に保存された遺伝子構成を持つ．プラスチドゲノムには，主に ptDNA 上の遺伝子の転写・翻訳に関わるタンパク質遺伝子や光合成機能に関わるタンパク質遺伝子がコードされている．これらの遺伝子やプロモーターなどの機能配列の解析，さらには，ptDNA の複製や遺伝様式を調べるための直接的な手段として，プラスチド形質転換系は非常に有効である．

プラスチド形質転換の成否を左右する因子としては，形質転換ベクターの設計と導入条件，植物材料の状態，形質転換体の選抜条件，および脱分化・再分化の効率などが考えられる．タバコが葉緑体形質転換でよく利用されるが，これは培養系が確立しており，植物の扱いが容易であることが背景にある．ゼニゴケの場合，DNA 導入の材料として，葉緑体に富み独立栄養培養が可能である培養細胞，および，旺盛に生育する分化初期の幼植物体（幼葉状体）を用いることで，高効率なプラスチド形質転換系の構築が可能となった[2,3)]．高等植物では DNA 導入や選抜とホモプラズム化に脱分化と再分化の培養系が利用されているが，ゼニゴケは，本来，分化全能性が高く，増殖が盛んであるために，特別な操作は必要としない（図 1）．ゼニゴケは，その生活環のユニークさと進化上の位置付けの重要性から，モデル植物として注目されている（1.4．大和らの頁を参照）．葉緑体遺伝子発現，DNA 複製や母性遺伝の研究にも，有望な材料である．ここではパーティクルガンを用いたゼニゴケ培養細胞および植物体のプラスチド形質転換法について解説する．

1）京都大学大学院生命科学研究科遺伝子特性学分野

### 3.b.2　実験の準備

ここでの実験は，パーティクルガン 10 ショット分で記載している．通常，プラスチド形質転換体は 10 株以上得られる．

[植物とプラスミド]

・ゼニゴケ培養細胞

1.4.大和らの頁を参照．継代培養後 7–10 日目の培養液を 70 ml（300 ml フラスコ 1 本分）．我々が使用する培養細胞系統は，長期間の培養のため，再分化能はない．培養細胞の利点を生かした研究に使用している．

・ゼニゴケ滅菌胞子嚢

1.4.大和らの頁を参照．プラスチド形質転換には滅菌胞子嚢を約 10 個用いる．機能解析に植物個体を扱う必要がある時に使用している．

・プラスチド形質転換ベクター

ここでは pCS31 ベクターを使用．pCS31 は pBS-

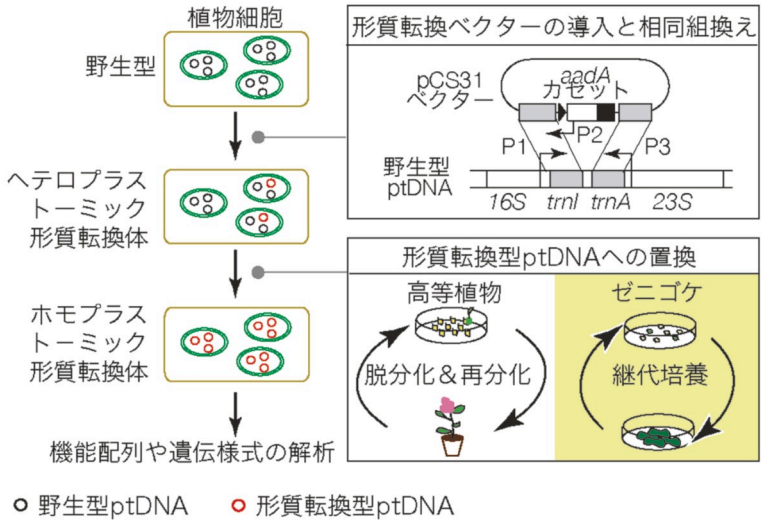



**図1**：プラスチド形質転換系の概略図．
プラスチド形質転換系は大きく分けて，形質転換ベクターの導入，プラスチド形質転換体の選抜，ホモプラストーミックな形質転換体の獲得の3段階から成る．外来遺伝子は相同組換えによってptDNAに組込まれる．ここではタバコ *rrn* プロモーターと *psbA* 遺伝子3'UTRの制御下にある *aadA* 遺伝子の発現カセットの両脇に約1 kbの *trnI* 及び *trnA* 遺伝子を持たせた形質転換ベクターであるpCS31を示す．図中のpCS31及び野生型ptDNA上の矢印はプラスチド形質転換体の選抜及び，ホモプラストーミックな形質転換体の確認に用いるプライマーを表す．P1, 5'-ACCCATTAAATTATCCTTAGCATG-3', P2, 5'-TGGATCCCTCCCTACAACTG-3', P3, 5'-TGCCTAGGTATCCACCGTAA-3'．形質転換後初期のプラスチド形質転換体では一部のptDNAが組換え型である（ヘテロプラストーミック）．選抜圧下でptDNAが複製・分配されるにつれて，野生型ptDNAが全て形質転換型ptDNAに置換される（ホモプラストーミック）．

SK+の *Sma*I制限酵素部位に約2 kbのゼニゴケ *trnI*～*trnA* 遺伝子領域をサブクローニングし，*trnI* と *trnA* の遺伝子間領域にタバコ *rrn* プロモーターと *psbA* 遺伝子3'UTRの制御下にあるスペクチノマイシン耐性遺伝子 *aadA* の発現カセットを組込んだもの（図1）．QIAGEN Plasmid Midi Kitで抽出して1 μg/μlに調整する．線状DNA断片を利用する場合は *aadA* カセットと相同配列を含む制限酵素断片をゲル抽出によって調製する．

**[機器・器具]**

- 吸引濾過器（Nalgene：134 mm x 230 mm，＃300-4050）
  オートクレーブで滅菌しておく．
- 水流アスピレーター
- 円形濾紙　10枚（Whatman：No.1 $\phi$ 55 mm）
  培養細胞の場合のみ使用．ガラスシャーレに入れてオートクレーブしておく．
- 円形セロファン　10枚
  植物体の場合のみ使用．プラスチックシャーレの大きさよりも少し小さめに切って，洗浄・オートクレーブしたもの．
- 細胞破砕用ペッスル
  オートクレーブで滅菌しておく
- パーティクルガン（Bio-Rad：PDS-1000/He Particle delivery system）
- 0.6 μm金粒子（Bio-Rad：＃165-2262）
  20 μg/μlの懸濁液を110 μlずつ1.5 mlチューブに入れたもの．−30°C保存可能．
- 900 psi Rupture Disk 10枚（Bio-Rad：＃165-2328）
- Macrocarrier（Bio-Rad，＃165-2335）10枚
- Stopping Screen（Bio-Rad，＃165-2336）10枚
  Ruptur Disk，Macrocarrier，Stopping Screenは使用分だけエタノールにくぐらせて滅菌したあと，クリーンベンチ内で乾燥させて，プラスチックシャーレに入れる．

**[試薬・培地]**

- 滅菌超純水
- 10 μg/ml RNase A入りTris-HCl（pH 8.0）
- 70% エタノール
- 99% エタノール
- 中性フェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール溶液（25：24：1）
- 2.5 M塩化カルシウム（分注して−30°C保存）
- 0.1 Mスペルミジン（分注して−80°C保存）
- スペクチノマイシン二塩酸塩五水和物（SIGMA，＃S9007-5G）

超純水で50 mg/mlに調整してフィルター滅菌，−30°C保存．

・尿素フェノール液
5 M尿素，0.3 M塩化ナトリウム，50 mM Tris-HCl pH 8.0，20 mM EDTA pH 8.0，5%(v/v) フェノール pH 7.0，0.5% SDS．4 °Cで約1ヶ月は保存可能．

・0-M51Cまたは1M51C寒天培地　10枚

・培養細胞の選抜培地　2 l
スクロースを含まない1M51C寒天培地をオートクレーブする．培地が65°C程度まで冷えてから，上記のフィルター滅菌したスペクチノマイシン溶液を終濃度500 μg/mlになるように加える．40 mlずつプレートに流し込んで50枚程度の選抜培地を作製する．

・植物体の選抜培地　2 l
スクロースを含まない0M51C寒天培地をオートクレーブする．培地が65°C程度まで冷えてから上記のフィルター滅菌したスペクチノマイシン溶液を終濃度300 μg/mlになるように加えて，40 mlずつプレートに流し込んで50枚程度の選抜培地を作製する．

## 3.b.3　実験方法

### 3.b.3.1　植物の準備

[ゼニゴケ培養細胞]

1．形質転換ベクター導入の前日に，継代培養7日目のゼニゴケ培養細胞を吸引濾過器で濾紙上に1 mmほどの厚みで円形に集める（図2 A）．

2．集めた細胞を濾紙ごと1-M51C寒天培地の中央に置き，翌日まで22°C，連続光下(50–60 μmol photons $m^{-2}$ $s^{-1}$）に静置する．

[ゼニゴケ植物体]

1．1ショット当たり1つの滅菌胞子嚢を100 μl滅菌水に懸濁し，セロファンを敷いた0M51C寒天培地の中央に100 μl滴下して1週間培養する（図2 B，C）．

2．形質転換ベクター導入の前日に幼植物体まで育った

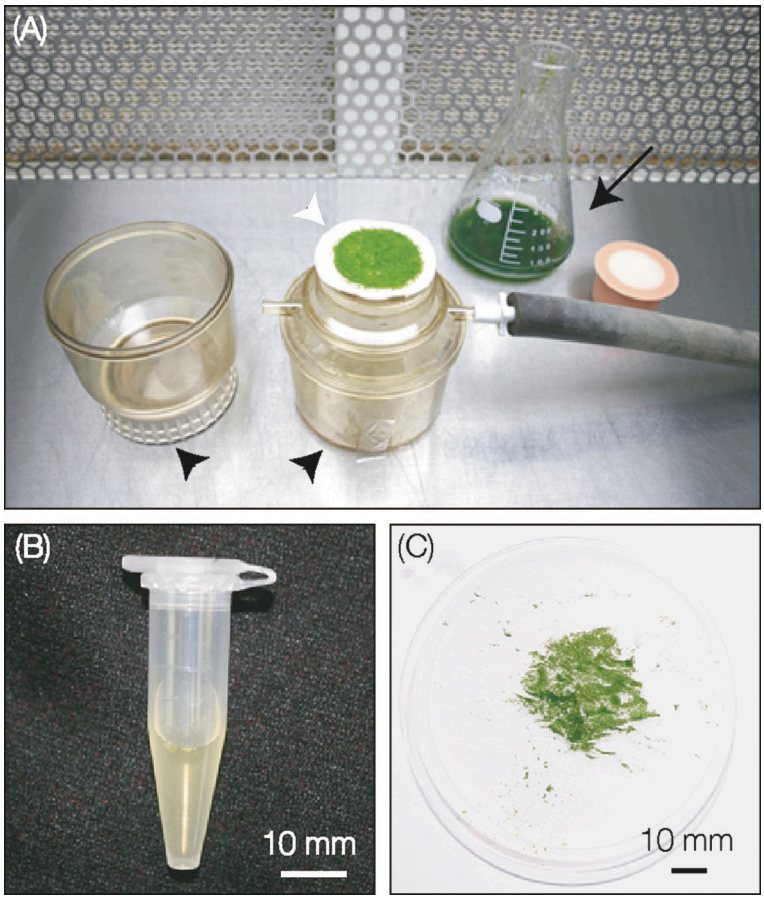



**図2**：パーティクルガンのターゲットとなる植物の準備．
(A) ゼニゴケ培養細胞の準備．継代培養後7日目の細胞（矢印）を吸引濾過器（黒色矢頭）によって濾紙上に円形に集めた様子（白色矢頭）．(B，C) ゼニゴケ幼植物体の準備．(B) 胞子懸濁液．(C) 胞子から1週間育てたゼニゴケ幼植物体．選抜培地へ移す際に剝がし易くするために培地上にセロハンを敷いている．

ゼニゴケの集団を直径25〜30 mmの円形になるようにピンセットなどで整える．

### 3.b.3.2　形質転換ベクターの金粒子へのコーティングと導入

1．保存している金粒子懸濁液を遠心分離（6,000× g，1 min）し，上清のエタノールを捨て，1 ml滅菌水を加えてボルテックスでよく懸濁する．
2．遠心分離（2,000× g，3 min）を行い，上清を捨てる．
3．滅菌水を230 μl加えて，金粒子をボルテックスで完全に懸濁させる．
4．2.5 M $CaCl_2$ 250 μl，プラスチド形質転換ベクター（1 μg/μl）25 μl，1 Mスペルミジン50 μlを順番に手早く加えて，ボルテックスで懸濁する．
5．氷上に静置し，1分ごとに10秒間のボルテックスによる懸濁を10回繰り返す．
6．遠心分離（2,000× g，3 min）を行い，上清を捨てる．500 μlエタノールを加えて，ボルテックスで洗浄する．チューブの壁に金粒子が付着する場合は，チップの先でこそぎ取る．これを計2回繰り返す．
7．遠心分離（2,000× g，3 min）を行い，上清を捨てる．60 μlのエタノールを加えてボルテックスで金粒子を懸濁する．ピペッティングによる懸濁はしないこと．
8．調製した金粒子を懸濁して，フォルダにセットしたMacrocarrierに5.4 μlずつ塗布して乾燥させる（以降は無菌操作）．
9．パーティクルガンを操作して，準備した金粒子をターゲットに打ち込む（ターゲットとの距離は120 mm，28 inHg，900 psi）．

### 3.b.3.3　スペクチノマイシン耐性株の選抜

1．形質転換ベクター導入後の細胞を翌日まで22℃，連続光下（50-60 μmol photons $m^{-2}s^{-1}$）に静置する．
2．形質転換ベクター導入後のプレート上の細胞を4等分して，滅菌水を数滴垂らした選抜培地上にピンセットで均一に広げる（図3 A，B）．
3．選抜培地上に広げた細胞を3〜4週間培養する（図3 C，D）．
4．緑色のスペクチノマイシン耐性株を20株以上新しい選抜培地に移し，番号をつける．株が混ざらないように注意して1枚の選抜培地に10株程度移してもよい．使用する形質転換ベクターによって異なるが，我々の実験では無作為に選んだスペクチノマイシン耐性株のうち5〜70%程度がプラスチド形質転換体であっ

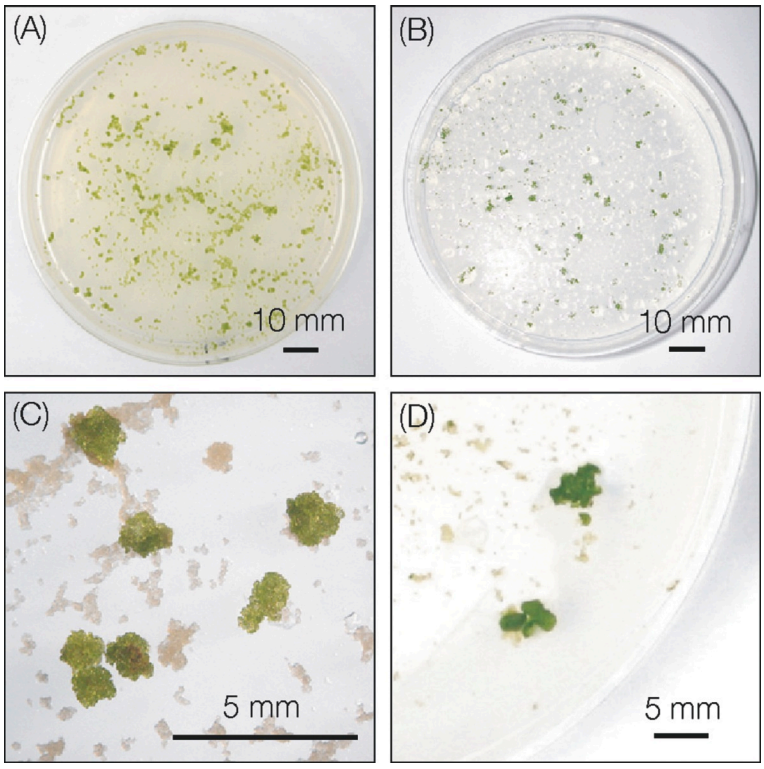



**図3**：スペクチノマイシン耐性株の選抜．
（A，B）スペクチノマイシン耐性ゼニゴケ培養細胞の選抜．形質転換ベクター導入後の培養細胞（A）または幼植物体（B）を選抜培地上に滅菌水を用いて密集しないように均一に広げた様子．（C，D）スペクチノマイシン耐性株の獲得．選抜開始3〜4週間後に緑色のスペクチノマイシン耐性の培養細胞（C）または植物体（B）が得られる．

た．そのため，20 株以上は新しい選抜培地に移す必要がある．

### 3.b.3.4　プラスチド形質転換体の選択とホモプラズム化

1．成長したスペクチノマイシン耐性株の一部をサンプリングして 1.5 ml マイクロチューブに移す．10 mg 程度で十分．培養細胞なら 2 mm 程度．植物体はごく小さい段階でも 1 mm 程度の組織をメスなどで切り取って調べることが可能．仮根以外の緑色の組織ならば切り取る場所は問わない．
2．100 μl の尿素フェノール液をチューブに加えて，プラスチックペッスルで細胞を破砕する．
3．破砕液に 400 μl の尿素フェノール液を加えてよく混和してから，フェノール・クロロホルム抽出とエタノール沈殿を行う．沈殿に RNase A を終濃度 10 μg/ml で含む Tris-HCl（pH 8.0）を 100〜200 μl 加えてトータル DNA 溶液とする．QIAGEN の DNeasy Plant Mini Kit でも PCR 用の total DNA 抽出は可能である．
4．ベクターに持たせた ptDNA の相同配列の外側に設計したプライマーと（図 1，P 1 プライマー），*aadA* カセットの部分に設計したプライマー（図 1，P 2 プライマー）のセットを用いて PCR を行う．
5．目的の領域に外来遺伝子が挿入されている株を選び，新しい選抜培地へ移植する．
6．得られたプラスチド形質転換株がホモプラストーミックになるまで，株の一部を 2 〜 3 週間ごとにスクロースを含む選抜培地へ植え継ぐ．ホモプラストーミックであることはベクターに持たせた ptDNA の相同配列の外側に設計したプライマーセットを用いた PCR で確認する（図 1，P 1 と P 3 プライマー）．

培養細胞の場合，最初の選抜培地で細胞塊が出現してから，12〜16 週間で野生型のプラスチド DNA が PCR で検出されない程度のホモプラストーミックな株が得られる（図 4 A）．植物体の場合，最初の選抜培地から単離した時点でホモプラストーミックなプラスチド形質転換体も得られる（図 4 B）．ホモプラストーミックなラインが得られない場合は，無性芽を数回選抜培地へ継代培養する．

## 3.b.4　まとめと考察

相同組み換えに依存するプラスチド形質転換において，遺伝子導入位置の設計は重要である．形質転換ベクター

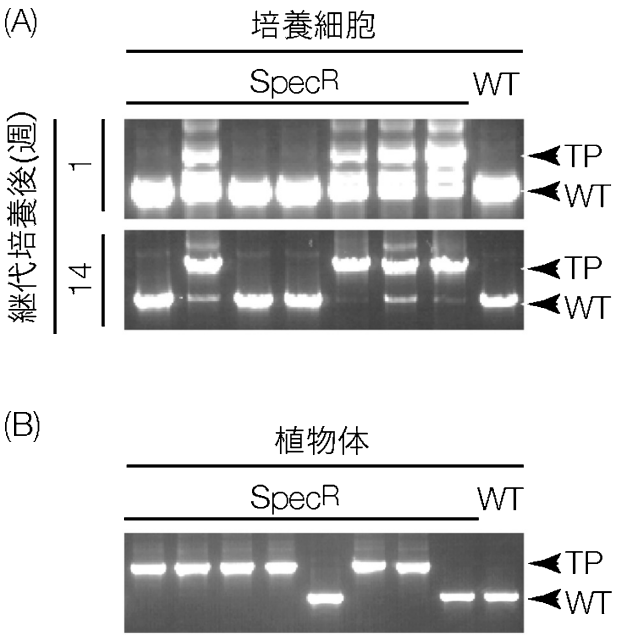



**図 4**：PCR によるホモプラストーミックなプラスチド形質転換体獲得の確認．
（A，B）ゼニゴケ培養細胞（A）および植物体（B）におけるスペクチノマイシン耐性株の *trnI*〜*trnA* 遺伝子間領域への *aadA* カセットの組込みを図 1 の矢印で示したプライマーセット（P 1 と P 3）を用いた PCR で調べた．増幅断片の長さは野生型 ptDNA 由来（WT）が 2,179 bp，プラスチド形質転換型 ptDNA 由来（TP）が 3,563 bp となる．（A）培養細胞ではホモプラストーミックな形質転換体を得るまでに 12〜16 週間かかる．（B）植物体では選抜直後の段階において，すでに大半の株がホモプラストーミックである．

の設計において，*trnI-trnA* 遺伝子間に組込まれた外来遺伝子が高発現すると報告された[4]．ゼニゴケも含めて，現時点の様々な植物におけるプラスチド形質転換法でも *trnI-trnA* 遺伝子間領域が外来遺伝子の挿入部位として広く用いられている[5]．他の領域を標的にして形質転換体は得られているが，遺伝子導入が困難な部位も存在した（千代田，未発表）．

また，ゼニゴケのプラスチド形質転換において重要となるのは，選抜培地からスクロースを除くことである．それに加えて，植物体ではターゲットを胞子から 1 週間育てた幼植物体として，直線状の形質転換ベクターを導入することが重要である．上記の方法で得られるスペクチノマイシン耐性株の数は 1 プレート当たり培養細胞と植物体でおよそそれぞれ 100〜200 株と 10 株である．しかし，選抜培地にスクロースを加えた場合，出現する薬剤耐性株は増加するが，プラスチド形質転換体でない擬陽性の株がスペクチノマイシン耐性株全体の 90%以上を占めてしまう．これらの擬陽性の株は一過的な耐性株もしくは核形質転換体であると思われる．スクロースを

添加せずに光合成に依存して生育させることで葉緑体機能に対する選抜圧があがり，結果的にプラスチド形質転換体が優先的に生き残ることで選抜後にプラスチド形質転換体の割合が増加すると考えられる[2]．著者らの実験では最も効率の良い場合でスペクチノマイシン耐性株の70％程度が設計通りのプラスチド形質転換体であった．一度得られたホモプラストーミックなプラスチド形質転換体は，スペクチノマイシンを含まない培地（植物体の場合はバーミキュライト）に移しても少なくとも半年は安定してホモプラストーミックな状態を維持することを確認している．

## 参考文献


1）K. Ohyama, H. Fukuzawa, T. Kohchi, H. Shirai, T. Sano, S. Sano, K. Umesono, Y. Shiki, M. Takeuchi, Z. Chang, S. Aota, H. Inokuchi, & H. Ozeki, Nature **322** (1986) P.572.

2）S. Chiyoda, P. J. Linley, K. T. Yamato, H. Fukuzawa, A. Yokota, & T. Kohchi, Transgenic Res. **16** (2007) P.41.

3）S. Chiyoda, K. Ishizaki, H. Kataoka, K. T. Yamato, & T. Kohchi, Plant Cell Rep. **27** (2008) P.1467.

4）B. De Cosa, W. Moar, S. B. Lee, M. Miller, & H. Daniell, Nat. Biotechnol. **19** (2001) P.71.

5）D. Verma, & H. Daniell, Plant Physiol. **145** (2007) P. 1129.

# 4．ヒメツリガネゴケ

杉田　　護[1)]，田崎　瑛示[1)]，香村　吉洋[1)]

ヒメツリガネゴケは植物の中では例外的に相同組換え能が高いため，核ゲノムと葉緑体ゲノムに遺伝子を導入することが容易である．導入法としては，ポリエチレングリコール法が一般的であるが，パーティクルボンバードメント法も適用可能である．

## Transformation of *Physcomitrella patens*

Mamoru Sugita, Eiji Tasaki, Yoshihiro Komura

Homologous recombination occurs at a high frequency between genomic sequences in transforming DNA and the corresponding chromosomal or chloroplast sequences, allowing precise inactivation or modification of genes. For the transformation of *Physcomitrella patens*, polyethylene glycol (PEG)-mediated transformation of protoplasts is almost exclusively applied even though particle bombardment is as well applicable.

### 4.1　ポリエチレングリコールを用いたプロトプラストへの遺伝子導入

ポリエチレングリコール（PEG）法によるヒメツリガネゴケの形質転換と相同組換えによる効率の高い遺伝子ターゲティングが，スイスのDidier Schaeferらによって初めて報告された[1,2]．ヒメツリガネゴケの胞子体（原糸体と茎葉体など）のゲノムはハプロイドであるため，遺伝子を破壊するとその影響がすぐに現れ，逆遺伝学による遺伝子機能の解析に適している．同法による形質転換の実験プロトコルは自然科学研究機構　基礎生物学研究所　生物進化研究部門長谷部研究室ホームページ（http://moss.nibb.ac.jp/）やフライブルグ大学のReski研究室ホームページ（http://www.plant-biotech.net/）から入手できる．同法はコケ原糸体細胞のプロトプラストの調製，PEGを用いたプロトプラストへのDNAの導入，薬剤耐性形質転換体の選択の3つのステップからなる．ここでは当研究室で行っている核と葉緑体の形質転換の実験手順を紹介する[3,4]．

#### 4.1.1　原糸体細胞のプロトプラストの調製（所要時間：1.5時間）

使用する試薬および培地のうち重要なものを下線で示し，その組成と調製レシピを表1にまとめた．

ヒメツリガネゴケ原糸体を4日毎に植え継ぐ．ヒメツリガネゴケの培養と植え継ぎの方法については（1）植物・藻類・細菌の材料の入手と栽培・培養，5．ヒメツリガネゴケを参照されたい．

↓

植え継ぎ後3日目の原糸体が生育した培養プレート（直径9 cmプラスチックシャーレ）10〜12枚分からプロトプラストを調製する．クリーンベンチ内で原糸体を滅菌ピンセットでかき集めて，25 mlのドリセラーゼ溶液[注1]

**表1．**使用した試薬と培地の組成

ストック溶液

●ストックA（×100）　4 ℃保存
0.5 M $Ca(NO_3)_2$
4.5 mM $FeSO_4 \cdot 7\,H_2O$

●ストックB（×100）　4 ℃保存
2.5% $MgSO_4 \cdot 7\,H_2O$

●ストックC（×100）　4 ℃保存
2.5% $KH_2PO_4$
pH 6.5に4 M KOHで調製する．

●ストックD（×100）　4 ℃保存
1 M $KNO_3$
4.5 mM $FeSO_4 \cdot 7\,H_2O$
酸化して茶色になったら新しいストックを調製する．

● Alternative TES液（×1000）
0.0055%（0.22 mM）$CuSO_4 \cdot 5\,H_2O$
0.0614%（10 mM）$H_3BO_3$
0.0055%（0.23 mM）$CoCl_2 \cdot 6\,H_2O$
0.0025%（0.1 mM）$Na_2MoO_4 \cdot 2\,H_2O$
0.0055%（0.19 mM）$ZnSO_4 \cdot 7\,H_2O$
0.0389%（2 mM）$MnCl_2 \cdot 4\,H_2O$
0.0028%（0.17 mM）KI

[注1] ドリセラーゼ溶液（使用直前に調製する）
2 % Driserase-20（協和発酵工業株式会社）
8 % D-Mannitol

1）名古屋大学遺伝子実験施設

の入った50 mlガラス製遠心管（IWAKI TE-32 PYREX）に入れる．原糸体はシャーレの周辺部1 cmを残し中央部のみをかき集める．

↓

ガラス製遠心管をアルミホイルで覆い，25℃の培養室またはインキュベータ内で，5分毎にガラス製遠心管を横向きのままゆっくりと半回転まわす．この操作を30分間行い，細胞壁を除去する．

↓

口径40 μmのナイロンメッシュでプロトプラストを濾過し，50 mlガラス製遠心管に集める．ナイロンメッシュはガラス製ロートにセットし，アルミホイルで包んでオートクレーブしたものを用いる．

↓

1,000 rpm，4 ℃で2分間遠心（TOMY TS-7ローター使用）し，プロトプラストを沈殿させる．

↓

上清を25 mlメスピペット（または駒込ピペット）を用いて捨てる．上清を少量残し，ゆっくりと回転しながらプロトプラスト沈殿を懸濁する．

↓

沈殿懸濁液に8％マンニトール溶液を遠心管の壁面にそってゆっくりと加え40 mlにする．

この遠心と洗浄の操作をあと2回繰り返す．

＊3回目の遠心をする前のプロトプラスト－マンニトール混液（40 ml）の一部を取って，血球計算盤を用いてプロトプラストの総数と濃度を算出しておく．

↓

3回目の遠心後，$1.6\times10^6$ プロトプラスト/mlになるようにMMM溶液[注2]をプロトプラスト沈殿に壁面にそってゆっくりと加えて懸濁し，これをプロトプラスト溶液とする．通常，7〜20 mlのプロトプラスト溶液が得られる．

ここまでの作業を可能な限りクリーンベンチ内で行う．

＊50 mlのファルコンチューブにドリセラーゼ粉末を0.5 g入れ，8％ D-mannitolを25 ml加え溶解する．これを4,000 rpmで5分間遠心する．上清をシリンジに入れフィルター滅菌（0.45 μm）しながら，50 mlのガラス製遠心管（IWAKI PYREX）に入れる．

[注2] MMM溶液（20 ml，使用当日に調製する）
0.5 M D-Mannitol
15 mM $MgCl_2$
0.1% MES
フィルター滅菌（0.22 μm）する．

### 4.1.2 プロトプラストへのDNAの導入
（所要時間：2日間）

使用する試薬，および培地は表1にまとめた．

30 μlの＊DNA溶液（30 μg DNA断片），300 μlのプロトプラスト溶液，300 μlのPEG/T溶液[注3]の順に，14 mlポリピレン丸底チューブ（ファルコン352006）に加えて混合し，45℃（恒温水槽）で5分間，20℃で10分間インキュベートする．

＊市販のキット（QIAGEN）で調製したプラスミドDNAを制限酵素で完全消化し直鎖状にする．さらにフェノール処理，エタノール沈殿してから，オートクレーブ滅菌したミリQ水（またはTE）に溶解する．DNA濃度を1 μg/μlに調整する．

↓

プロトプラスト液体培地[注4] 6.5 mlを10回に分けて30分間かけて穏やかに加える．加える手順：0.3 mlを3分毎に5回，次に1 mlを3分毎に5回加える．最初の3回までは加える都度，チューブを指で軽くはじく（退屈で根気を要する作業．気の短い人には向かない）．

↓

三三九度の要領で全量をプラスチックシャーレ（直径6 cm，IWAKI code 1010-060）に移し，フタをしてからパラフィルムでシールする．さらにアルミホイルで遮光し，箱に収めて25℃で一晩〜24時間培養する．ここまでの所要時間：1.5時間．

↓

翌日，P 5000ピペットマンを用いてプロトプラスト液を15 mlファルコンチューブ（35-2096）に移し，1,000 rpm，4℃，2分間遠心分離し，プロトプラストを沈殿させて上清をデカントまたはP 5000ピペットマンを用いて除く．

↓

[注3] PEG/T溶液（使用当日に調製する）
40% Polyethylene glycol 6000（PEG 6000）
0.1 M $Ca(NO_3)_2$
0.01 M Tris-HCl（pH 8.0）
7.2% D-Mannitol
2 gのPEG 6000とスターラーバーをキャップ付き硬質バイアル瓶（20 ml容量）に入れてオートクレーブし，これに上記のフィルター滅菌（0.22 mm）した混合溶液5 mlを加え，よく溶かして調製する．

[注4] プロトプラスト液体培地（100 ml，使用当日に調製する）
1×ストックA
1×ストックB
0.1×ストックC
0.005% Diammonium（＋）-Tartrate（（＋）-酒石酸ジアンモニウム）和光純薬
6.6% D-Mannitol
0.5% Glucose

予め45℃保温したPRM/T溶液[注5]をP5000ピペットマンまたは10 mlメスピペットを用いてチューブの壁面にそってゆっくりと8 ml加える．直ぐに予め透明セロハン[注6]を敷いたPRM/B培地[注7]に2 mlずつ分注し，プレート面に均一に広げる．この操作を寒天が固まらないにうちに手早く行う．

↓

シャーレをサージカルテープ（またはパラフィルム）でシールし，25℃連続明条件下で3日間培養する．

### 4.1.3 薬剤耐性形質転換体の選択（所要時間：4週間）

3日後，シャーレのふたを開け，2本のピンセットを用いて再生したコケをセロハンごと選択培地[注8]に移す．

↓

コケを移したシャーレをサージカルテープでシールし，25℃連続明条件下で培養する（図1）．このステップを1次スクリーニングと呼ぶ．

↓

3週間後にシャーレのふたを開け，生育したコロニーを先細ピンセットでつまみ，抗生物質などの薬剤を含まないセロハンなし汎用培地（BCDATGまたはBCDAT）[注9]に移す．コロニー毎にピンセットの先端をガスバーナーで焼く．プレートあたり25個～60個のコロニーを移す（図1）．

↓

1週間培養した後，コロニーの一部を新たな選択培地[注8]に移し，さらに2～3週間培養する．このステップを2次スクリーニングと呼ぶ．

↓

選択培地で生育したコロニーを安定な形質転換体として選抜する．

通常，300個のコロニーのうち50個の安定形質転換体が得られる．ただし目的とする遺伝子の性質によって得られる安定形質転換体の数は大きく変動する．

---

[注5] PRM/T溶液（45℃で使用する）
1×ストックB
1×ストックC
1×ストックD
1×Alternative TES
5 mM Diammonium（+）-Tartrate（(+)-酒石酸ジアンモニウム）
10 mM $CaCl_2 \cdot 2H_2O$
8％ D-Mannitol
0.8% agar（Sigma A9799, Plant Cell Culture Tested）
オートクレーブした後で，45℃に保温する．残った溶液は室温で保存しておき，使用前にもう一度オートクレーブする．

[注6] 透明セロハンの前処理と保存
市販のセロハンには培養に適さないものがある．例えば，セロハンの表面が撥水性を示す，あるいはオートクレーブによりセロハンが白く変質するタイプは培養に適さない．当研究室では，フタムラ化学のセロハン（PL#300）を使用している．
セロハンの洗浄方法：シャーレの大きさに切ったセロハン300枚を5 mM EDTA（pH 8.0）液500 ml中でオートクレーブする（1000 mlビーカーを用いる）．オートクレーブ後，セロハンをミリQ水（あるいは蒸留水）500 ml中で念入りにピンセットを用いてすすぎ，ミリQ水500 mlを入れてオートクレーブ滅菌する．この操作をもう一度繰り返す．前処理済みのセロハンを室温保存する．培養のコンタミはセロハンが原因となる場合が多いので，使用直前に必ずもう一度オートクレーブする．

[注7] PRM/B培地（プロトプラスト再生培地）（使用前日に調製する）
1×ストックB
1×ストックC
1×ストックD
1×Alternative TES
5 mM Diammonium（+）-Tartrate（(+)-酒石酸ジアンモニウム）
10 mM $CaCl_2 \cdot 2H_2O$
6% D-Mannitol
0.8% agar（Sigma A9799, Plant Cell Culture Tested）
オートクレーブし，シャーレにまいて固める．使用直前まで25℃に保つ．

[注8] 選択培地（汎用培地＋薬剤）
汎用培地（BCDATまたはBCDATG）をオートクレーブ後，50℃までさまし，クリーンベンチ内で下記の薬剤を加えよく混ぜ，プラスチックシャーレに分注する．
20 mg/ml ジェネティシン（G 418，50 mg/ml geneticin disulfate solution, WAKO 075-04893），マーカー遺伝子 *nptII* を用いる時に使用する．
または，30 mg/ml ハイグロマイシンB（50 mg/ml Hygromycin B solution, WAKO 084-07681），マーカー遺伝子 *hpt*（*aphIV*）を用いる時に使用する．
または，50 mg/ml ゼオシン（100 mg/ml Zeocin, Invitrogen 46-0509），マーカー遺伝子 zeocin resistant gene（*ble*）を用いる時に使用する．
または，500 mg/ml スペクチノマイシン（spectinomycin dihydrochloride pentahydrate，粉末，Sigma, 091K1257），葉緑体形質転換のためのマーカー遺伝子 *aadA* を用いる時に使用する．

[注9] 汎用培地（BCD）
1×ストックB
1×ストックC
1×ストックD
1×Alternative TES
1 mM $CaCl_2 \cdot 2H_2O$
0.8% agar（Sigma A9799, Plant Cell Culture Tested）
オートクレーブし，シャーレにまく．1ヶ月間室温保存．

[注9] 汎用培地（BCDG）パーティクルボンバードメント法によるDNAの導入に用いる．
BCD培地に0.5% glucoseを加える．
オートクレーブし，シャーレにまく．1ヶ月間室温保存．

[注9] 汎用培地（BCDAT）
BCD培地に5 mM Diammonium（+）-Tartrate（(+)-酒石酸ジアンモニウム）を加える．
オートクレーブし，シャーレにまく．1ヶ月間室温保存．

[注9] 汎用培地（BCDATG）
BCDAT培地に0.5% glucoseを加える．
オートクレーブし，シャーレにまく．1ヶ月間室温保存．

選択薬剤存在下でプロトプラストから再生した形質転換体には，導入 DNA が核ゲノムに組み込まれた安定形質転換体（stable transformant）の他に，核ゲノムに不安定に組み込まれたり，ゲノムに組み込まれていない形質転換体（transient transformant）が存在する．これらの形質転換体を排除し安定形質転換体のみを分離するために，一度選択薬剤を含まない培地で 1 週間培養し，再び選択薬剤を含む培地で培養（2 次スクリーニング）する．この再選択で生き残った形質転換体を安定形質転換体として選抜する（図 1）．

#### 4.1.4　相同組換えの確認

形質転換体コロニーが小さい段階でコロニーPCR 法を行い簡便に相同組換えの有無を調べる[5]．さらに，プレート 5 枚分のコケ原糸体からゲノム DNA を調製しゲノミックサザン解析を行う．両者の結果を照らし合わせて，導入遺伝子がゲノムに組み込まれたかどうかを判定する．

#### 4.1.5　留意点および課題など

(1)　導入する遺伝子は，薬剤耐性マーカー遺伝子の上流と下流にそれぞれターゲット領域のゲノム DNA 配列を連結するようにデザインする．ゲノム DNA 領域の長さはそれぞれ 1 kb 以上とる必要がある[6]．遺伝子破壊株を作製しようとする場合は，ターゲット領域に薬剤耐性マーカー遺伝子を挿入するよりも，ターゲット遺伝子をそっくり欠失させ薬剤耐性マーカー遺伝子と置換したコンストラクトを構築した方がよい．

(2)　導入した遺伝子がコンカテマーを形成してゲノム内に組み込まれることがある[7]．形質転換体の導入遺伝子のコピー数を調べておく必要がある．

(3)　形質転換用の導入 DNA は必ず断片化して直鎖状にしたものを用いる．プラスミドのまま導入すると，核ゲノムへの組み込みがほとんど起こらない．

(4)　PEG による形質転換法は，高価な遺伝子導入器機を必要とせず，簡便に行うことができる利点がある．しかし，PEG によってプロトプラスト融合が起こるため，コケ形質転換体がハプロイドではなくポリプロイドとなってしまうことがある[8]．得られた形質転換体を解析する前に，形質転換体の核相をプロイディーアナライザー（Patec 社 PA 型）により確認しておく．

(5)　プロトプラストの再生率が形質転換効率に大きな影響を与える．確実に形質転換体を得るには，胞子から発芽した原糸体を 3 〜 4 回継代したものを用いるとよい．

(6)　PEG 法は簡便ではあるが，プロトプラストを調製するのに手間がかかる．

### 4.2　パーティクルボンバードメントによる DNA 導入法

PEG 法によるヒメツリガネゴケの形質転換が報告された後に，パーティクルボンバードメント法でも DNA 導入が可能であることがいくつか報告された[9,10]．パーティクルボンバードメント法はコケの原糸体に直接 DNA を導入することができるので，PEG 法のようにプロトプラストを調製する手間がはぶけ，形質転換に使用する DNA 量も 5 $\mu$g と少量ですむなどの利点がある．当研究室では，PEG 法だけでなくパーティクルボンバードメントによる DNA 導入で，GFP 蛍光の一過的発現の観察と安定形質転換体の作製を行っている．当研究室で行っている同法の実験プロトコルを紹介する．

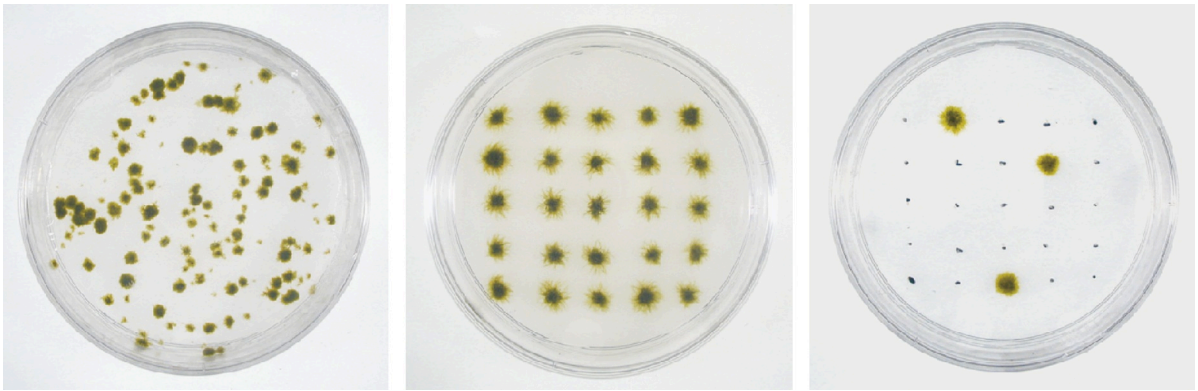


**図 1**：薬剤耐性形質転換体のスクリーニング
DNA 導入後 3 週間，ジェネティシンを含む選択培地（BCDAT＋G 418）で培養（1 次スクリーニング）し生育してきた多数の原糸体コロニー（左），左写真の原糸体コロニーをピンセットで拾い，ジェネティシンを含まない汎用培地（BCDATG）に移して 1 週間生育させた原糸体コロニー（中），中写真の 1 週間培養した原糸体コロニーの一部を新たな選択培地（BCDAT＋G 418）に移して 3 週間培養（2 次スクリーニング）した（右）．

#### 4.2.1　金粒子の滅菌処理（所要時間：1時間）

1.5 ml マイクロチューブに金粒子（径 1.0 μm BioRad, cat. ＃1652263）60 mg を入れる．

↓

70%エタノール（室温）を 1 ml 加え，5 分間ボルテックスする（TOMY MT-300 で最大の強さ）．

↓

室温で 15 分間静置する．

↓

15,000 rpm，2 秒間遠心する．

↓

P 1000 ピペットマンを用いて上清を捨て，ミリ Q 水を 1 ml 加える．

↓

1 分間ボルテックスした後，室温に 1 分間静置する．

↓

15,000 rpm，2 秒間遠心し，上清を捨てる．ミリ Q 水を 1 ml 加え，遠心と洗浄を 3 回繰り返す．

↓

滅菌した 50% グリセロールを 1 ml 加え，金粒子が均一になる程度にボルテックスする．

↓

−80℃で保存する．

#### 4.2.2　DNA 断片の金粒子へのコーティング（所要時間：0.5 時間）

50%グリセロールに保存しておいた金粒子液 25 μℓを 1.5 ml のマイクロチューブに入れ，ボルテックスミキサー（TOMY MT-300 など）にセットする．

↓

ボルテックスミキサーをスイッチ ON にし，ボルテックスの強さを 5.0〜5.5（中程度，こぼれない程度の強さ）にセットする．マイクロチューブのふたは開けた状態にする．

↓

次の試薬を順に加える．

2.5 M $CaCl_2$ 25 μℓ

DNA 溶液 14 μℓ（5 μg DNA 断片）

1 M スペルミジン 1 μℓ

滅菌水 15 μℓ（80 μℓになる）

↓

マイクロチューブのふたを閉めて，3 分間最大の強さでボルテックスする．室温で 1 分間静置する．

↓

5,000 rpm，4 ℃で 2 秒間遠心し，P 200 ピペットマンを用いて上清を捨てる．

↓

70%エタノール（室温）を 200 μℓ加え，P 200 を用いてピペッティングで懸濁する．チップ内に金粒子が付着しないように注意しながら軽くピペッティングする．

↓

5,000 rpm，4 ℃で 2 秒間遠心し，P 200 ピペットマンを用いて上清を捨てる．金粒子を吸い込まないように注意する．

↓

100%エタノール（室温）200 μℓを加え，ピペッティングで懸濁する．

↓

5,000 rpm，4℃で 2 秒間遠心する．

↓

上清捨て，100%エタノール 30 μℓを加え，ピペッティングで懸濁する．

↓

氷上へ

#### 4.2.3　コケ原糸体への DNA の導入（所要時間：0.5 時間）

パーティクルボンバードメントによる DNA 導入には，植え継ぎ後 3〜5 日目のコケ原糸体を用いる．コケ原糸体をプレート上（直径 9 cm プラスチックシャーレ）に十分に広げるため，0.5%グルコースを加えた BCDG 培地（透明セロハンは敷かない）で培養する．ここでは，㈱タナカ社の IDERA（GAS 法遺伝子導入装置）型式 GIE-III を使用した場合の操作手順と打ち込み条件を紹介する．

電源スイッチ（MAIN）が OFF，ポンプ作動スイッチ（PUMP RUN）が OFF，排気切換バルブ（EXHAUST VALVE）が OFF になっていることを確認する．

↓

ヘリウムガス圧調整バルブ（He PRESS ADJ（ACCEL））が反時計方向（ガス圧が低い）に位置しており，真空加圧調整バルブ（VACUUM ADJ（ACCEL）），ヘリウムガス減圧調整バルブ（He PRESS ADJ（REDUC）），チャンバーリークバルブ（AIR LEAK）が時計方向に一杯に回っていることをそれぞれ確認する．

↓

ヘリウムガスボンベのバルブを開き，ヘリウムガスレギュレーターの一次測を 7.0 kgf/cm² 以上に設定した後，二次測を 7.0 kgf/cm² 以下に設定する．

↓

MAIN スイッチを押す．

↓

排気遮断スイッチ（EXHAUST CUT）がOFFになっていることを確認する．

↓

ヘリウムガス圧計（He PRESS GAUGE）の表示を見ながら，希望する噴出ヘリウム圧力（4.0 kgf/cm²）に到達するまで，He PRESS ADJ（ACCEL）を時計方向に徐々に回す．

↓

（希望噴出圧力を超えてしまった場合は，操作マニュアルに従って調整する）

↓

PUMP RUNを押す．

↓

チャンバー内に試料（コケ原糸体が密生した培養プレート），DNAコーティング済み金粒子液（10 $\mu\ell$）を格納したフィルターホルダーをセットし，扉を閉める．培養プレートの底面3カ所をマジックでマークしておく．試料とフィルターホルダー先端の間の距離を75 mmに設定する．フィルターホルダーは使用直前に70%エタノール液中から取り出し，クリーンベンチ内で乾燥させてから金粒子液を加える．

↓

EXHAUST　VALVEをVACUUM表示位置に回し，VACUUM GAUGEの表示を見ながら希望する真空圧（600 mmHg）に到達したところで，EXHAUST VALVEをOFFの表示位置に戻す．

↓

READYの点灯を確認する．

↓

STARTスイッチを押す．これにより，金粒子が噴射しコケに打ち込まれる．

↓

AIR LEAKを徐々に反時計方向に回し，チャンバー内に空気を入れる．

↓

試料（培養プレート）を残したまま，フィルターホルダーだけを取り出す．次に，DNAコーティング済み金粒子液（10 $\mu\ell$）をフィルターホルダーにセットし，上記と同じ要領で金粒子を噴射しコケに打ち込む．これをもう1回繰り返す．このようにして，1枚の培養プレートあたりDNAコーティング金粒子液30 $\mu\ell$を3回に分けて10 $\mu\ell$ずつマジックでマークした位置に打ち込む．

↓

打ち込み終了後，装置の取り扱い手順に従って使用前の状態に戻す．

#### 4.2.4　薬剤耐性形質転換体の選択（所要時間：4週間）

金粒子を打ち込んだコケプレートをサージカルテープでシールし，暗所で（箱に入れて）25°C 3日間培養する．一過的発現を観察する場合は一晩の培養でよい．

↓

金粒子を打ち込んだ位置のコケ原糸体をピンセットでつまみ，6 mlのミリQ水が入った50 mlコーニングチューブ（430829）に入れ，コケ原糸体を粉砕する．粉砕は（1）植物・藻類・細菌の材料の入手と栽培・培養，5．ヒメツリガネゴケに準じて行う．

↓

コケ原糸体粉砕液2 mlずつを予め透明セロハンを敷いた選択培地3枚にまく．シャーレをサージカルテープでシールし，25°C連続明条件下で3週間培養する．これ以降の作業は4.1.3薬剤耐性形質転換体の選択と全く同じ．

↓

3週間後にシャーレのふたを開け，生育したコロニーを先細ピンセットでつまみ，抗生物質などの薬剤を含まないセロハンなし汎用培地（BCDATGまたはBCDAT）に移す．

↓

1週間培養した後，新たな選択培地に移し，さらに2～3週間培養する．

↓

選択培地で生育したコロニーを安定な形質転換体として選抜する．

当研究室では，ある遺伝子の下流にGFP遺伝子をノックインする形質転換を行った際，1次スクリーニングで選抜した360個のコロニーを2次スクリーニングに回した結果，19個の安定形質転換体コロニーを得た．

#### 4.2.5　留意点と対処法

噴射されたヘリウムガス圧によって，コケ試料が吹き飛ぶことがある．これは，培地上についた水分が原因と考えられる．打ち込む金粒子液とコケ試料プレートを常に余分に用意しておく．

## 参考文献


1）D. Schaefer, J. P. Zryd, C. D. Knight, & D. J. Cove, Mol. Gen. Genet. **226** (1991) P.418.

2）D. G. Schaefer, & J. P. Zryd, Plant J. **11** (1997) P.1195.

3）C. Sugiura, & M. Sugita, Plant J. **40** (2004) P.314.

4）M. Hattori, H. Miyake, & M. Sugita, J. Biol. Chem.

**282** (2007) P.10773.
5）G. Schween, S. Fleig, & R. Reski, Plant Mol. Biol. Rep. **20** (2002) P.43.
6）Y. Kamisugi, K. Schlink, S. A. Rensing, G. Schween, M. von Stackelberg, A. C. Cuming, R. Reski, & D. J. Cove, Nucleic Acids Res. **34** (2006) P.6205.
7）Y. Kamisugi, A. C. Cuming, & D. J. Cove, Nucleic Acids Res. **33** (2005) P.e173.
8）G. Schween, S. T. Egener, D. Fritzowsky, J. Granado, M. C. Guitton, N. Hartmann, A. Hohe, H. Holorf, D. Lang, J. M. Lucht, C. Reinhard, S. A. Rensing, K. Schlink, J. Schulte, & R. Reski, Plant Biol. **7** (2005) P.228.
9）W. Sawahel, S. Onde, C. D. Knight, & D. J. Cove, Plant Mol. Biol. Rep. **10** (1992) P.315.
10）S. H. Cho, Y. S. Chung, S. K. Cho, Y. W. Rim, & J. S. Shin, Mol. Cells **9** (1999) P.14.

# 5．シロイヌナズナの形質転換

鹿内　利治[1)]

シロイヌナズナの形質転換は，技術的にほぼ完成されており，容易に簡便に行うことができる．以前は vacuum infiltration 法がよく使われたが，最近は floral dip 法[1)] が主流である．

## Transformation of *Arabidopsis thaliana*

Toshiharu Shikanai

Transformation technique of *Arabidopsis thaliana* has already been established almost completely. Although vacuum infiltration was routinely used previously, the transformation became even more efficient and simple by the establishment of floral dip method.

### 5.1　植物の準備

1．プラスチックポットに培養土を入れ，表面をネットで覆う．これはアグロバクテリウム懸濁液に逆さまに浸ける際，土がこぼれ落ちたいようにするためである．流し台の水切りネットなどを適当な大きさに切って，輪ゴムでポットに固定する．ネットと培養土に隙間が入らないように，培養土は山盛りにする．

2．直径 75 mm の丸形ポットの場合，10〜20 粒の種子を蒔く．約 1 か月後，伸びた花茎を切除（摘心）し，さらに花茎の誘導を促す．さらに 2 週間ほどしたら形質転換に用いる．

### 5.2　形質転換の操作

1．形質転換に用いるアグロバクテリウムを準備する．我々は *Agrobacterium tumefaciens* MP90（C58C1），ASE などを用いている．形質転換の 1 週間ほど前，菌を新しくプレートに広げておくと（新鮮な菌を準備する），その後の培養時間をコントロールしやすい．

2．50 ml の無菌プラスチックチューブに 5 ml の抗生物質入りの LB を加え，プレートからアグロバクテリウムのコロニーを少し多めに取り加える．一晩 23℃で震盪培養する．培養温度は 25℃でもかまわない．

3．翌日，抗生物質入りの LB 200 ml を含む 1 l フラスコに 200 μl の前培養液を加え，一晩（約 16 時間）震盪培養する．翌日 $OD_{600}$ が 0.8〜1.2 になったら培養をやめ，氷上に移す．

4．培養液を遠心チューブに移し，集菌する．JLA100．500 ローターの場合は，4000 rpm，5 分，4 ℃の遠心を行う．

5．上清を捨て，菌を 200 ml の懸濁用培地[注1] に懸濁し，500 ml ビーカーに移す．

6．実験台にラップを敷き，その上で形質転換用の植物を逆さまにし，ロゼッタ葉までアグロバクテリウム懸濁液に浸す．しばらく置いて引き上げ，5 分後，もう一度懸濁液に浸す．

7．広げたラップの上に植物を寝かせて置き，地上部をラップでくるむ．上部を折りたたんで閉じる．作業の間，70%エタノールのスプレーを用意し，アグロバクテリウムで実験台を汚染させないようにする．

8．ラップでくるんだ植物をそのまま 1 日通常条件で育て，ラップを外す．さらに植物を同じように育て，種を集める．この種が $T_1$ 世代になる．

### 5.3　形質転換植物の選抜

1．耳かき一杯程度の種子を 1.5 ml チューブに取り，3 %次亜塩素酸 1 ml を加えて 10 分間滅菌する．

1）京都大学理学研究科

注1　懸濁用培地
1/2×MS 塩
10% ショ糖
0.5 g/L MES
KOH で pH を 5.7 に合わせる．
使用直前に，ベンジルアミノプリン（1 mg/mL ストック，DMSO 中）を 2 μl と Silwet-L77 を 40 μl 加える．Silwet-L77 は Lehle　seeds（http://www.arabidopsis.com/main/cat/VacInStuff/%21vis.html）から購入できるようだが，少量ならシロイヌナズナを扱っている研究室から分与してもらうと良い．

2．1 ml の滅菌水で 2 回種子を洗う．
3．チューブを良くふった後，選択培地上[注2] に流す．すぐに 2 ml の 0.15%アガー（無菌）を加え，まんべんなく種子が行き渡るように培地を回す．
4．サージカルテープで封をし，アルミホイルに包んで冷蔵庫で数日置く．
5．アルミホイルから出し，23℃で培養する．場合よって非形質転換体も枯死せず緑を保つが，生育の差で形質転換体との見分けは容易である．
6．本葉が 5 ～ 6 枚出たら，鉢あげする．最初は鉢をラップで包み，高湿を保ち，徐々に大気の湿度に馴らす．
7．個々の植物をライン化し，$T_2$ 種子を採種する．必要があれば T-DNA が一カ所挿入されたラインを選び（薬剤耐性か可能であれば表現型が $T_2$ で 3：1 に分離），そこからホモ個体（$T_3$ ですべて形質転換体）を得て保存する．この際，薬剤耐性を指標にすると，しばしば導入した目的遺伝子と連鎖していない問題が起きる．PCR で目的導入遺伝子の存在を確認する必要がある．

**注意**

すべての作業はクリーンベンチ内で行う．一連の作業は遺伝子組換え実験であり，機関による承認を受けていなければ行うことはできない．

## 参考文献

1）S. J. Clough & A. F. Bent, Plant J. **16** (1998) P.735.

[注2] 選択培地
MS 塩
1% ショ糖
0.5 g/L MES
KOH で pH を 5.7 にあわせ，寒天を 0.8%になるよう加える．

# 6．タバコ形質転換
## a．核ゲノム

長尾　一生[1)]，山本　義治[2)]，小保方潤一[2,3)]

ここではアグロバクテリウムを用いたタバコの核ゲノムの形質転換について紹介する．タバコは葉緑体の形質転換も可能な数少ない植物であり，また大きく育つので生化学実験にも適している．無傷葉緑体も簡単に調製出来る．

## *Agrobacterium*-mediated tobacco nuclear transformation

Issei Nagao, Yoshiharu Y Yamamoto, Junichi Obokata

Tobacco is a model plant that can be used for both nuclear and chloroplast transformation. In this chapter, we introduce well established methods for *Agrobacterium*-mediated transformation of the tobacco nucleus. The protocol includes introduction of a binary vector into *Agrobacterium*, inoculation of tobacco leaf disks with *Agrobacterium*, and selection and regeneration of transformed tobacco.

### 6.a.1　試薬の調製

#### 6.a.1.1　ストック

1．抗生物質など

Chloramphenicol　25 mg/ml になるようにエタノールに溶解，−20℃で保存．

Claforan　医療用の無菌粉末を 100 mg/ml になるように滅菌水に溶解し，−20℃で保存．

Gentamycin　100 mg/ml になるように蒸留水に溶解し，フィルター濾過により滅菌，−20℃で保存．

Hygromycin　25 mg/ml になるように蒸留水に溶解し，フィルター濾過により滅菌，−20℃で保存．

Kanamycin　100 mg/ml になるように蒸留水に溶解し，フィルター濾過により滅菌，−20℃で保存．

Phosphinothricin（glufosinate, biaraphos, BASTA の有効成分）　10 mg/ml になるように蒸留水に溶解し，フィルター濾過により滅菌，−20℃で保存．

Rifampicin　25 mg/ml になるようにメタノールに溶解し−20℃で保存．

Spectinomycin/streptomycin　100 mg/ml になるように蒸留水に溶解し，フィルター濾過により滅菌，−20℃で保存．

2．植物ホルモン

BAP（benzyl aminopurine）　1.0 mg/ml になるように 70%エタノールに溶解，−20℃保存．

IAA（indole acetic acids）　1.0 mg/ml になるように 70%エタノールに溶解，−20℃保存．安定性がやや低いので半年ごとにストックを作り直す．

#### 6.a.1.2　培地

1．MS（Murashige & Skoog）培地

無機塩類ミックス及び 1,000 倍ビタミンミックスが和光純薬等から市販されているのでそれらを用いる．必要ならショ糖も加える（1〜5%）．溶解後 1 N KOH を用いて pH 5.6 に合わせる．用途に応じて寒天（0.8%）を加え撹拌してからオートクレーブする．用いる寒天は INA AGAR GA-10, 30（伊那食品工業．フナコシから入手可），Bacto-Agar（Difco）などがある．オートクレーブ後熱いうちに撹拌し寒天を完全に溶解させる．抗生物質や植物ホルモンはオートクレーブ後 60-70℃に冷ましてから加える．培養に用いる容器類はとりわけ丁寧に蒸留水ですすぎ，洗剤等の混入を避ける．培養専用にして洗剤では洗わないことにしておくのもよい．

2．YEB 培地

アグロバクテリウム用の液体もしくは寒天（Bacto-Agar 1.2%）培地．1 l 当たり Bacto-Peptone（Difco）5 g，Beef Extract（Difco）5 g，Bacto-Yeast Extract（Difco）1 g，ショ糖 5 g，2 mM $MgSO_4$，1 N NaOH で pH 7.2 に合わせてオートクレーブ．

1）北海道大学・大学院先端生命科学研究院・次世代ポストゲノム研究棟・細胞機能科学
2）名古屋大学遺伝子実験施設・遺伝子解析分野
3）京都府立大学・大学院生命環境科学研究科・植物ゲノム情報学

#### 6.a.1.3　培養容器

1．深底シャーレ

高さ 2 cm 程度のもの．カルス培養に用いる．ガス滅菌よりは γ 線滅菌されたものを選ぶとよい．テルモや Biobik などから入手可．

2．マジェンタ容器（GA-7，Sigma）

高さ 10 cm のオートクレーブ可能なプラスチック容器．シュートや幼植物の培養に用いる．

### 6.a.2　アグロバクテリウムへのプラスミド導入

アグロバクテリウムは双子葉植物に感染する土壌細菌でありバクテリアが持つ Ti プラスミドや Ri プラスミド上の T-DNA 領域が植物の染色体 DNA に組み込まれる[1,2]．この性質を利用して外来遺伝子を植物体に導入する方法が考案された[3]．ここではまず，一般的に用いられているバイナリーベクター系[4] を用いた実験について解説する．外来遺伝子導入，植物での過剰発現，人工的に作成した RNAi を用いた遺伝子発現抑制，レポーター遺伝子導入等の目的のために多数のバイナリーベクターが作成されているが，その一部を表 1 に紹介した．

本章では pBI101[5] を例にして方法を紹介する．このベクターはバクテリア及び植物で作用するマーカー遺伝子として共にカナマイシン抵抗性遺伝子を含むので，下記のプロトコールではアグロバクテリウム及びタバコの選抜はカナマイシンで行っている．他のベクターを用いる場合は選抜マーカーに合わせて抗生物質を変える必要がある．アグロバクテリウムと植物の選抜マーカーは通常別の遺伝子が担っているので，用いる抗生物質等も異なるのが普通である．リーフディスクの培養時にクラフォランを加えるのはアグロバクテリウムを除くためであり，異なるベクターであっても変える必要は無い．

バイナリー法で用いることの出来るアグロバクテリウム（*Agrobacterium tumofaciens*）はいくつかあるが，LBA 4404 株[6] がタバコ界では一般的である．LBA 4404 の選抜マーカーはリファンピシン（50 μg/ml）である．

#### 6.a.2.1　アグロバクテリウムへのベクター導入（2～3日）

バイナリーベクターは大腸菌とアグロバクテリウムの両方で複製可能である．以下に大腸菌から調製したベクターをエレクトロポレーションを用いてアグロバクテリウムに導入する方法を説明する．

##### 6.a.2.1.1　エレクトロポレーション用コンピテントセルの調製（1日）

1）アグロバクテリウムのコンピテントセルを調製する．300 ml の YEB 培地に植菌し，$OD_{600}$ が 0.5～0.6 になるまで（5 時間程度）28℃で震盪培養する．

2）6000 rpm，5 分間，4 ℃で遠心して上清を除き，氷冷した 10％グリセロールで 3 回程度洗浄する．

3）100～200 μL の 10％グリセロールに懸濁して 50 μl ずつ分注して液体窒素中で凍結させる．−80℃で保存する．

##### 6.a.2.1.2　エレクトロポレーション法によるアグロバクテリウムの形質転換（2～3日）

1．融解したコンピテントセル 50 μl にベクターを 50～100 ng 入れ，エレクトロポレーション用キュベット（電極間の幅 1.0 mm）に移す．キュベットは使用時まで氷冷しておく．

2．BioRad 社のエレクトロポレーター（GenePulser）を用いる．抵抗値 200 Ω，電気容量 25 μF，電圧 1.7 kV で電気パルスをかける（放電時間は 13 msec 程度になる）．用いるキュベットが 1.0 mm 幅ではなく 2.0 mm 幅の場合は電圧は 2.5 kV にする．放電後すぐに 1 ml

**表 1**：主なバイナリーベクター

| ベクター名 | 大腸菌／アグロバクテリウム選抜マーカー | 植物選抜マーカー | 大腸菌・アグロバクテリウムでのコピー数 | メモ | 入手先情報など |
|---|---|---|---|---|---|
| pBI[5] | Kan | Kan | 低 | GUS レポーター | TAIR/ABRC，http://www.arabidopsis.org/ |
| pPZP[8]，pPZPY[9] | Cap，Strep/Spec | Kan，Gent | 高 | マーカーのすべての組合せあり．pPZPY は植物での高発現カセット． | pPZP: Dr. Pal Maliga, Rutgers University, maliga@mbcl.rutgers.edu pPZPY: http://www.gene.nagoya-u.ac.jp/~obokata-g/yyy/plasmid.html |
| pGREEN[10] | Kan | Kan，Hyg，Bar，Sul | 高 | 各種レポーターとの組合せあり | http://www.pgreen.ac.uk/ |

選抜マーカー（耐性が付与される抗生物質）略称　Bar: biaraphos/phosphinothricin, Cap: chloramphenicol, Gent: Gentamycin, Hyg: hygromycin, Kan: kanamycin, Spec: spectinomycin, Step: streptomycin, Sul: sulphonamide.他にも多数ベクターが開発されている[11]．

の YEB 培地を加えて懸濁し，試験管に移して 28℃で 1～2 時間震盪培養する．

3．培養液の全量と 1/100 量をそれぞれカナマイシン（25 μg/ml），リファンピシン（LBA 4404 の場合．濃度は 50 μg/ml）を含む YEB 寒天培地にスプレッダーで広げて，28℃で 2～3 日間静置培養すると，コロニーが現れる．

#### 6.a.2.2 アグロバクテリウムに導入されたベクターの確認（2～3 日）

導入したプラスミドは稀に組み換えを起こし思いがけない構造になっている場合があるため，アグロバクテリウムからプラスミドを抽出し制限酵素パターンの確認を行う．コンストラクトあたり 3 クローン程度見ておく．もし問題が起きたクローンを用いて実験を進めてしまった場合，その発見は非常に遅れることが予想されるので，ここで確認しておいた方が安心である．

アグロバクテリウムからは大腸菌で行われるアルカリ法とほぼ同様の方法でプラスミドを精製出来るが，ゲノムの混入や精製度を向上させるために以下の改変法を用いる[7]．シリカレジンを用いた大腸菌用プラスミド精製キット（Wizard Minipreps DNA Purification System, Promega など）を用いてもよい．その場合はキットの説明書に従ってプラスミドを精製する．

1．カナマイシン（25 μg/mL）を含む 2 mL の YEB 培地で 28℃，1～2 日間培養する．一部をプラスミド精製用に用い，一部をグリセロールと混合して－80℃で保存する．
2．10000 rpm，3 分間，4 ℃で遠心し，上清を除く．
3．リゾチーム（4 mg/ml）を含む TEG（25 mM Tris-HCl pH 8.0，10 mM EDTA，50 mM glucose）で充分に懸濁し，室温で 10～30 分間静置する．
4．0.2 ml のアルカリ液（1％ SDS，0.2 N NaOH）を加えて転倒混和し，10 分間室温で静置する．
5．二倍量のアルカリ液で飽和させた 30 μl のフェノール溶液を加え，転倒混和して充分に混合する．
6．150 μl の 3 M 酢酸ナトリウム（pH 4.8）を加えて転倒混和し，15 分間，－20℃で冷やす．
7．15000 rpm，15 分間，4 ℃で遠心し，上清を新しいチューブに移す．
8．イソプロパノールを加えて遠心し，上清を捨てる．
9．100 μl の TE に溶解して LiCl 沈殿を行い，高分子の RNA を除く．
10．エタノール沈殿を行って 100 μl の TE に溶解する．
11．RNaseA（50 μg/ml）を加えて 30 分間室温で静置する．
12．フェノールクロロホルム抽出を 2 回行う．
13．エタノール沈殿を行い，20～50 μl の 0.1 x TE に溶解する．
14．制限酵素で切断して目的のプラスミドが導入されたか確認する．

プラスミドに問題がないことを確認したクローンを用いて，植物体への感染を行う．

### 6.a.3 植物へのアグロバクテリウムの感染，形質転換細胞の選抜と個体再生

ここで紹介するリーフディスク法と呼ばれるタバコの形質転換法は，簡便で導入される遺伝子のコピー数も少なく，優れた方法として行われてきた．植物体の葉を 1 cm 角に切ってアグロバクテリウムを感染させ，組み換え体の選抜，カルス誘導を行い，その後植物ホルモンの量を調整して植物体を再生させる．これらの操作は無菌的に行うため，無菌的に生育させたタバコを用意して実験を行う．

#### 6.a.3.1 感染に用いる植物体の準備（2 週間程度）

無菌的に植物を育成するため，まず種子の滅菌を行い，MS 寒天培地に播種し発芽させる．その後，マジェンタ容器に移し 10 cm 程度まで育成し，葉を感染に用いる．タバコの培養は 25℃，明期 16 h/暗期 8 h で行う．

1．種子を 100～200 粒程度マイクロチューブに入れる．
2．エタノールを 1 ml 入れ，5 分間ボルテックスし，軽く遠心して種子を落とし，エタノールを除く．これを 2 回行う．
3．次亜塩素酸滅菌溶液（1.5% 次亜塩素酸，0.02% Triton-X100）を 1 ml 加え，15 分間ボルテックスにかける．
4．遠心して種子を落とし，上清を除く．
5．滅菌水で 3 回程度洗浄する．
6．100 μl 程度の滅菌水を加え，熱したメスで先を切ったブルーチップを用いて一粒ずつ，MS 寒天培地に播種する．
7．パラフィルム（もしくはサージカルテープ，住友 3 M）を巻いて 1 週間程度生育させる．
8．ある程度，芽が育ってきたら，培地の入ったマジェンタ容器に移植し，本葉が展開するまで生育させ感染実験に用いる．育ちすぎて培養コンテナが窮屈になってきたら，茎と葉一枚を含むようにメスで切り取り，茎を新しい培地に挿すと，枝の付け根のところから茎頂点が，培地に挿した茎からは根が発達してくる．

［培養メモ］

褐変した組織片があるとシャーレ全体に調子が悪くなることがあるので，具合の悪そうな組織片が現れたシャーレからはすみやかに元気な組織片だけを新しい培地に移すとよい．

### 6.a.3.2　植物体への感染と形質転換カルスの選抜，個体再生（3週間〜）

無菌的に生育させたタバコの葉をメスを用いて四角く切りアグロバクテリウムを感染させる．感染させたリーフディスクは，抗生物質と植物ホルモンを含むMS培地で芽が出るまで培養する．芽が出てきたら，適宜植え継ぎながら植物体の再生を行う．この操作は，カビや雑菌が混入しやすいので十分に注意して行う．

1．目的のベクターを保持したアグロバクテリウムを抗生物質を含む3 mlのYEB培地で28°C，24時間程度培養する．5000 rpm，5分間，室温で遠心して集菌し，抗生物質を含まないYEB培地に懸濁して感染に用いる．

2．無菌的に生育させた植物体を角シャーレ上でメスを用いて1 cm角程度に刻み，乾燥しない様に液体のMS培地に浮かべる（葉の裏側を上にする）．主脈は除く様にする．感染させるアグロバクテリウムのクローンに対して20枚程度用意する．

3．10 cmシャーレに葉の裏を上にして置き，菌液を注いで葉になじませる様にして数分静置する．

4．滅菌したティッシュの上に葉片を置いて余分な菌液を除き，10 cmシャーレのMS寒天培地に葉片の裏側を上にして置く．この時，寒天を崩す様にして葉が乾かない様に埋めるように置くと良い．

5．シャーレをパラフィルムでシールし，培養する．無菌的に培養したタバコと言ってもカビの胞子等が付着していることもあるので，数枚のシャーレに分けて操作する方が無難である．

6．36〜48時間後，リーフディスクをMS液体培地に浸して軽く洗浄し，過剰のアグロバクテリウムを除く．これを2回行う．

7．滅菌したティッシュで余分な水分を除き，抗生物質と植物ホルモン（クラフォラン500 μg/ml，BAP 1 μg/ml，IAA 0.1 μg/ml）を含むMS寒天培地に移して培養する．

8．4〜5日後，クラフォラン400 μg/ml，カナマイシン100 μg/ml，BAP 1 μg/ml，IAA 0.1 μg/mlを含むMS寒天培地に移して培養する．

9．1〜2週間程度培養すると芽が出て来るので，芽が出ている部分を切り離し，クラフォラン300 μg/ml，カナマイシン100 μg/ml（植物ホルモン無し）を含むMS寒天培地に移して培養する．芽が出ていないリーフディスクは，クラフォラン300 μg/ml，カナマイシン100 μg/ml，BAP 1 μg/ml，IAA 0.1 μg/mlを含むMS寒天培地で培養する．また，1週間程度の培養で培地が黄ばんで来る事があるが，その場合は新しい培地に植継ぐ．リーフディスク一枚から1個体だけを選ぶと，確実に独立した形質転換体が得られる．その場合リーフディスク20枚からは最大20の形質転換個体が得られる．

10．芽が大きくなり発根してきたら，MS寒天培地（クラフォラン100 μg/ml，カナマイシン100 μg/ml）の入ったマジェンタ容器に移し，10 cm程度まで生育させる．

［操作メモ］

・カルスから再生した形質転換体は希にキメラである場合がある．

・カルス化・再生の際に希に倍数化してしまう場合がある．細胞が大きいものはその可能性が高い．孔辺細胞に含まれる葉緑体数を数え，野生型個体の倍程度あれば倍数化している．

### 6.a.3.3　鉢上げ

10 cm程度に育った植物はプラスチックボックスから取り出し，根に付着している寒天培地を水道水で丁寧に洗浄し（根を傷つけないように），鉢上げをし，隔離温室で生育させ種子を得る．

1．組織を採取した後の植物体は，プラスチックボックスから丁寧に培地ごと取り出し，主な寒天培地を軽く手で取り除いた後，水道水をかけながら根を傷つけない様に優しく洗い流す．培地が多く残るとカビや雑菌が生えてしまう．

2．鉢は4号を用いる．底に割れた鉢の破片等で穴を塞ぎ，メトロミックス，バーミキュライトの順に等量入れ，たっぷりと水を注いでおく．用意した鉢に指で穴を開けておき，寒天培地を洗い流した植物体を深めに埋める．プラスチックボックスで培養してきた植物体は乾燥に弱いので，最初はビニール袋を被せておく．1週間程度経ったら，ビニール袋の角の部分をハサミでカットし，さらに数日経ったら，袋の底を抜く様にして乾燥に慣らしていく．植物が元気に育っていたら，ビニール取り外して生育させる．乾燥して萎れているようなら，再度ビニール袋を被せる等しておく．

3．植物が成長して蕾を付けてきたら，紙袋等を被せて自家受粉させる．導入した遺伝子が1遺伝子座なら，得られた種子をカナマイシンを含む培地に播種する

と，メンデルの法則に従って白色のカナマイシン感受性の個体が 4 分の 1 現れる．

4．形質転換世代（$T_1$）もしくは次世代（$T_2$）の組織を用いてサザンハイブリダイゼーションや PCR により導入遺伝子の確認を行う．

## 6.a.4 最後に

以上タバコを用いて形質転換を行う方法の概略を述べた．植物の培養は期間が長いためにカビ等の混入の影響を大きく受ける．従って操作や生育環境には十分注意して行う必要があるが，同時にある程度ダメになることを見越して材料等は余分に用意する．植物培養操作の習熟は必要になるが，形質転換に関してはそれほど難しい操作は無いため，慣れれば必ず出来る．

## 参考文献


1）M. F. Thomashow, R. Nutter, A. L. Montoya, M. P. Gordon, & E. W. Nester, Cell **19** (1980) P.729.

2）M. F. Thomashow, R. Nutter, K. Postle, M. D. Chilton, F. R. Blattner, A. Powell, M. P. Gordon, & E. W. Nester, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **77** (1980) P.6448.

3）K. A. Barton, A. N. Binns, A. J. Matzke, & M. D. Chilton, Cell **32** (1983) P.1033.

4）M. Bevan, Nucleic Acids Res. **12** (1984) P.8711.

5）R. A. Jefferson, T. A. Kavanagh, & M. W. Bevan, EMBO J. **6** (1987) P.3901.

6）A. Hoekema, P. R. Hirsch, P. J. J. Hooykaas, & R. A. Schilperoort, Nature **303** (1983) P.179.

7）C. R. Walkerpeach, & J. Velten, Plant Molecular Biology Manual, Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, 1994, pB1: 1.

8）P. Hajdukiewicz, Z. Svab, & P. Maliga, Plant Mol. Biol. **25** (1994) P.989.

9）Y. Y. Yamamoto, M. Matsui M, L.-H. Ang, & X.-W. Deng, Plant Cell **10** (1998) P.1083.

10）R. P. Hellens, E. A. Edwards, N. R. Leyland, S. Bean, & P. M. Mullineaux, Plant Mol. Biol. **42** (2000) P.819.

11）R. Hellens, P. Mullineaux, & H. Klee, Trends Plant Sci. **5** (2000) P.446.

# 6．タバコ
## b．葉緑体ゲノム

黒田　洋詩[1)]

葉緑体形質転換は，葉緑体遺伝子発現機構や遺伝子産物の機能解析などの基礎研究から有用タンパク質の生産などの応用研究まで広く利用されている．本章では，パーティクルデリバリー法によるタバコ葉緑体形質転換法を紹介する．

## Biolistic method of tobacco plastid transformation

Hiroshi Kuroda

Plastids of plants carry their own genomes and gene expression system.　Plastid transformation is a powerful tool to study gene expression system and functions of gene products encoded in plastid genomes.　This chapter describes a biolistic method to obtain tobacco plants that carry stably transformed plastid genomes.

### 6.b.1　はじめに

光合成の場として知られる葉緑体は，プロプラスチドから分化した色素体の一形態であり，そこでは光エネルギーを化学エネルギーへと変換する反応だけでなく，色素合成，アミノ酸生合成など様々な反応が行われている[1)]．単細胞緑藻などとは異なり，多細胞の植物には異なる組織・器官があり，そこには機能的に分化した色素体が存在する．現在のシアノバクテリアと同じ祖先から進化したとされる色素体は，独自のゲノムとその発現系を持つ．タバコの場合，色素体ゲノムは約 156 kb の環状 DNA であり，そこには約 120 遺伝子がコードされている（図 1）[2,3)]．このうち，約 80 種類がタンパク質をコードする遺伝子であるが，いくつかの遺伝子産物の機能は長い間不明であった．クラミドモナスとタバコを材料にした葉緑体形質転換法による解析が行われるようになり，機能不明な遺伝子は残りわずかになってきた．また，葉緑体遺伝子発現機構の解析などの基礎研究から，ワクチンなどの医学的に重要なリコンビナント・タンパク質の生産，除草剤や害虫などに抵抗性をもつ植物の作出などの応用研究まで非常に幅広くこの技術が利用されている．本章ではまず，葉緑体形質転換法を用いてこれまでに行われた研究について簡単に触れ，続いて実際のプロトコールを紹介する．

1）名古屋市立大学大学院システム自然科学研究科

### 6.b.2　葉緑体形質転換法の確立

1986 年にタバコとゼニゴケで葉緑体ゲノムの全塩基配列が発表された[2,4)]．これにより，多くの機能不明の遺伝子や ORF が葉緑体ゲノムに含まれていることが明らかになり，それらの機能や遺伝子発現系の解析が葉緑体機能を探る上で重要な課題となった．一方，緑葉に存在するタンパク質の 50％以上が葉緑体に局在すること，ま

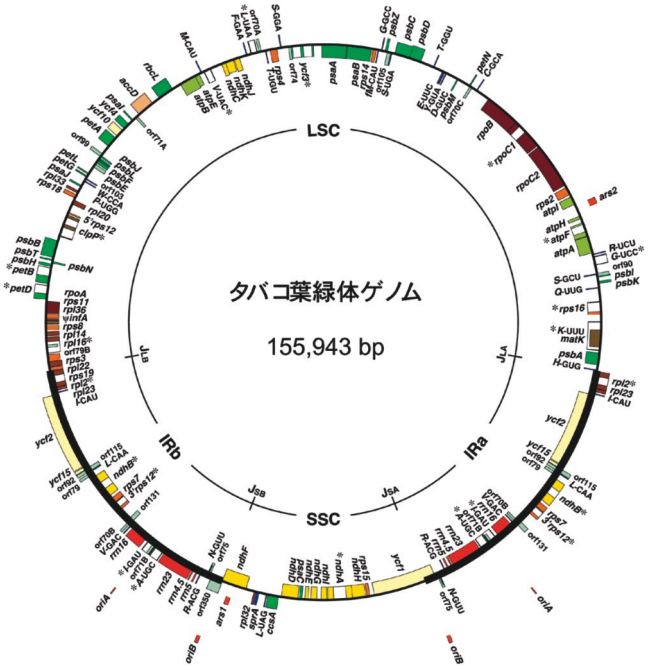



図 1：葉緑体ゲノム地図（2005 年版）[3)]．名古屋市立大学の湯川真希，杉浦昌弘両氏および愛知学院大学の續伯彦氏のご好意により提供していただいた図を改変した．

た，例えばタバコでは 1 細胞あたり約 10,000 コピーの葉緑体 DNA が存在することから，葉緑体ゲノムへ外来遺伝子を導入できれば，高レベルの組換えタンパク質の生産が可能になると考えられた．そのため，多くの研究者が様々な植物の葉緑体ゲノムの形質転換を目指して，研究を行った．

Boynton らは単細胞の緑藻クラミドモナスを用いて，相同組換えによる葉緑体ゲノムへ外来遺伝子を導入することに世界で初めて成功した[5]．クラミドモナスは細胞中に約 80 コピーの DNA をもつ葉緑体を一つしかもたないため，葉緑体形質転換の材料として適した生物であった．彼らは，葉緑体 ATP 合成酵素の $\beta$ サブユニットをコードする *atpB* 遺伝子が部分的に欠損するために光独立栄養的に生育できない変異株をホストとして形質転換を行った．その結果，相同組換えにより正常な *atpB* 遺伝子が導入され，光独立栄養的に生育できる形質転換体を得ることができた．この方法では形質転換できるゲノム上の領域が限定されたが，1991 年に，Goldschmidt-Clermont により，抗生物質であるスペクチノマイシンに耐性を与える *aadA* 遺伝子を用いたクラミドモナス葉緑体形質転換法が発表され，葉緑体ゲノム上の任意の位置へレポーター遺伝子を導入したり，特定の遺伝子をノックアウトすることが可能となった[6]．

一方，多細胞の被子植物の葉緑体では，導入したレポーター遺伝子の一過的な発現は確認されていたが，安定な葉緑体形質転換体をなかなか得ることができなかった[7,8]．単細胞で葉緑体を一つしかもたないクラミドモナスと比べ，タバコを例にとると，細胞一つだけをみても約 100 コピーのゲノムをもつ葉緑体が約 100 個存在する[9]．つまり，1 細胞当たり葉緑体ゲノム約 10,000 コピーのすべてが均一に形質転換されなければならない高等植物では，葉緑体ゲノムすべてが形質転換した個体を得ることは非常に困難であることが予想されていた．そのような状況の中で，Svab らは抗生物質スペクチノマイシンとストレプトマイシンに耐性を与える変異を導入した *rrn16* を選択マーカーとして用い，タバコの葉緑体形質転換に高等植物で初めて成功した[10]．彼らはストレプトマイシン存在下で耐性株を選抜した後，ストレプトマイシン耐性を調べることで，組織培養の際に頻繁に出現するスペクチノマイシン耐性突然変異株と形質転換体を明確に区別した．1993 年には，クラミドモナス葉緑体形質転換で用いられた *aadA* 遺伝子を用いたタバコ葉緑体形質転換が報告され[11]，これ以降，タバコだけでなく，トマト[12]，ナタネ[13]，ニンジン[14]，ダイズ[15]，レタス[16]，ニンジン[14]，ポプラ[17]，コットン[18] などで葉緑体形質転換の成功が報告されている．葉緑体形質転換法により行われた研究についてまとめた非常に詳しい文献があるので，興味がある方は参照されたし[19]．

## 6.b.3　葉緑体形質転換法を利用した研究

図 2 は葉緑体ゲノムの形質転換を模式的に示したものである．葉緑体ゲノム（cpDNA）と形質転換ベクター（vector）上のターゲット領域間で相同組換えが起こり，選択マーカー遺伝子を含む領域が葉緑体ゲノムへ導入される（tp-cpDNA）．タバコ葉緑体形質転換では，図 2 A，2 B に示した外来遺伝子の導入と葉緑体遺伝子のノックアウトが主に行われており，図 2 C の葉緑体遺伝子の改変はタバコではあまり行われていない．

形質転換ベクターが葉緑体中へ導入されると，葉緑体 DNA とベクターDNA 間で組換えが起こり，まず少数の葉緑体 DNA が組換わる．最初のうちは一部の葉緑体

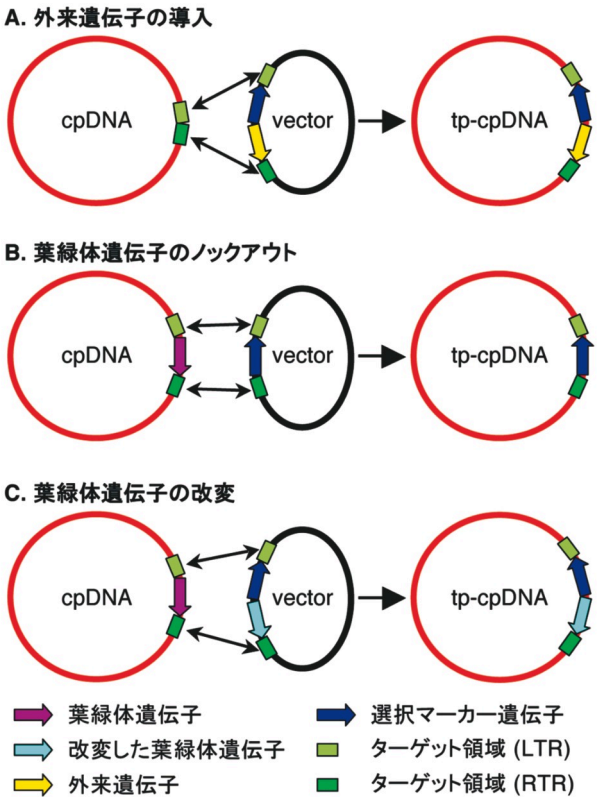



**図 2**：相同組換えによる葉緑体ゲノムの形質転換．A．外来遺伝子の導入．B．特定の葉緑体遺伝子のノックアウト．C．葉緑体遺伝子の改変．葉緑体 DNA（cpDNA）とベクター（vector）上の葉緑体 DNA 配列との間で相同組換えが起こり，ターゲット領域に挟まれた領域が置換した葉緑体 DNA（tp-cpDNA）が生ずる．LTR, Left Targeting Region; RTR, Right Targeting Region; cpDNA, chloroplast DNA; tp-cpDNA, transplastomic chloroplast DNA.

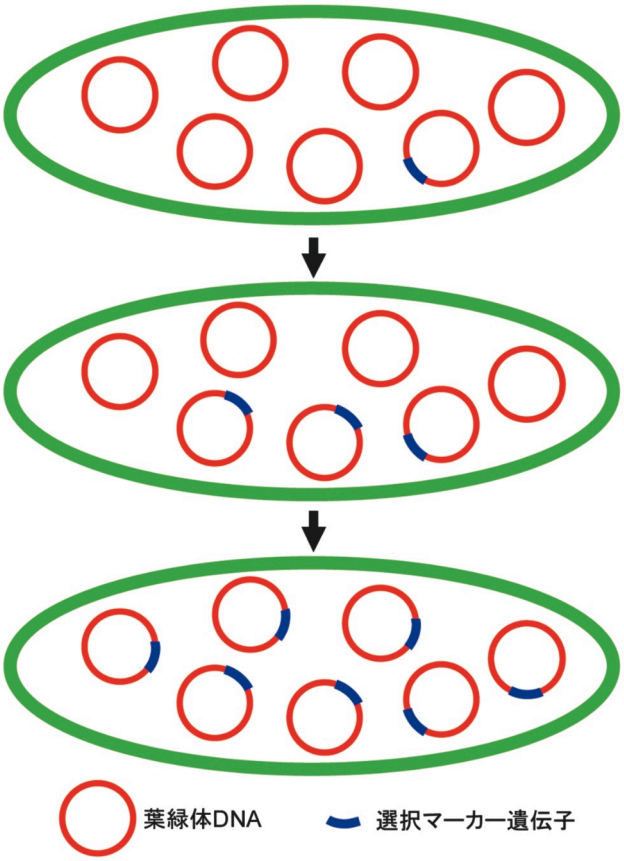



**図3**：形質転換した葉緑体ゲノムが徐々に増えて行く様子を模式的に示した図．選択圧のかかった状態で相同組換えと分裂を繰り返すことで，マーカー遺伝子を含む葉緑体が増えて行く．最終的に，葉緑体ゲノムがすべて置き換わったホモプラストミックな葉緑体形質転換体を得ることができる．

DNA コピーだけが置き換わったヘテロプラストミックな状態だが，選択培地で培養を続けるうちに組換え配列を含む葉緑体 DNA が増えて行き，最終的にすべての葉緑体 DNA が置き換わったホモプラストミックな状態になる（図 3）．一旦ホモプラストミックな状態になれば，選択圧をかけない状態にしても形質転換された葉緑体は安定に保持される．

#### 6.b.3.1　遺伝子発現の解析および外来遺伝子の発現

先の述べたように，葉緑体には独自のゲノムと遺伝子発現系がある．光化学系などの動的な分子構築や修復には，高度に制御された遺伝子発現系が重要な役割を果たしており，多くの研究者が単離葉緑体や無細胞系を用いて解析を行っていた．葉緑体形質転換法が確立されると，レポーター遺伝子を用いて遺伝子発現制御に関わるゲノム配列（シス制御配列）の解析が行われるようになった[19]．

最初に調べられたのは，光化学系 II 反応中心タンパク質 D1 をコードする *psbA* 遺伝子の発現制御機構で，Staub らは，*psbA* 遺伝子のプロモーターと 5' 非翻訳領域をつないだ *uidA* レポーター遺伝子を葉緑体ゲノムへ導入し，光に依存した D1 タンパク質の合成が翻訳開始の段階で 5' 非翻訳領域を介して行われると報告した[20,21]．また，転写に関しては，青色光依存型の *psbD* プロモーター[22]，Type II NEP の *clpP1* プロモーター[23]，構成的な *rrn16* プロモーター[24] の解析が行われた．このうち，*rrn16* プロモーターについては唯一 *in vitro* 転写系でも非常に詳細な解析が行われた[24]．

このほか，RNA プロセシング（*psbT-psbH*，*psbH-petB*）[25]，スプライシング（*atpI*）[26]，RNA エディティング（*psbL*，*ndhB*）[27–32]，RNA の安定性（*rbcL*）[33]，翻訳（*atpB*，*rbcL*，*psbA*）[34–36] に関わるシス配列の研究が行われた．このうち，RNA エディティングはクラミドモナス葉緑体では起こらないため，*in vivo* でシス配列の解析を行うにはタバコを用いるしかなかった[37]．

遺伝子発現系についての研究により得られた情報は，葉緑体において外来遺伝子を高発現させる研究に応用されている[19,38–40]．ワクチンなどの医学的に有用なタンパク質，生分解性プラスチックのような工業的に有用なタンパク質，除草剤や害虫に耐性を与える農業的に有用なタンパク質がその対象となっており，最近では，葉緑体における代謝系の改変なども行われている[19]．

#### 6.b.3.2　逆遺伝学的手法による葉緑体遺伝子産物の機能解析

タバコ葉緑体ゲノムにコードされる遺伝子のうち，これまでに約 50 種類のノックアウトが報告されている（表 1）．最初にノックアウトされたのは Rubisco の大サブユニットをコードする *rbcL* 遺伝子である[41]．原核型 RNA ポリメラーゼのサブユニットをコードする遺伝子をノックアウトした植物では，色素体に mRNA の蓄積が観察されたことから，核コードの別の RNA ポリメラーゼが確かに存在し，色素体遺伝子の転写を行っていることが明らかになった[42,43]．葉緑体 DNA は核ゲノム内にも存在することが知られているが[44]，上記のいずれのノックアウト株においても，核ゲノム内に存在する葉緑体遺伝子のコピーから発現するかもしれないタンパク質が葉緑体で機能するわけではないことも確認された．その後多くの遺伝子がノックアウトの対象となり，*ycf3*，*ycf6*，*ycf9* 遺伝子産物の機能はタバコで初めて明らかになった．このうち *ycf3* 遺伝子は植物において逆遺伝学的手法により機能が明らかになった最初の葉緑体遺伝子である[45]．

光合成の分野で特に重要だったのは，Ndh 複合体に関する研究である[90,91]．ヒトのミトコンドリアの NADH

**表 1**：これまでにノックアウトの対象となったタバコ葉緑体遺伝子等

| | |
|---|---|
| 光化学系 I | Clp プロテアーゼ |
| *psaJ*[46,47] | **clpP1*[73,74] |
| *ycf3*[45,48] | アセチル-CoA カルボキシラーゼ |
| 光化学系 II | **accD*[75] |
| *psbA*[49] | RNA ポリメラーゼ |
| *psbE*[50,51] | *rpoA*[43,48,76] |
| *psbF*[50,51] | *rpoB*[42,76] |
| *psbI*[52] | *rpoC1*[43,76] |
| *psbJ*[50,51,53] | *rpoC2*[43] |
| *psbL*[50,51] | リボソーム |
| *psbM*[54] | **rpl20*[77] |
| *psbTc*[55] | *rpl33*[77] |
| *psbZ*（*ycf9*）[56–59] | **rps2*[77] |
| シトクロム $b_6f$ 複合体 | **rps4*[77] |
| *petA*[48,60] | **rps14*[78] |
| *petB*[60] | **rps18*[79] |
| *petD*[60] | tRNA |
| *petG*[61] | **trnC*-GCA[80] |
| *petL*[61–63] | *trnG*-GCC[81] |
| *petN*（*ycf6*）[61,64] | **trnG*-UCC[81] |
| NDH 複合体 | **trnN*-GUU[80] |
| *ndhA*[65] | *trnV*-UAC[82,83] |
| *ndhB*[66,67] | 低分子 RNA |
| *ndhC*[65,68,69] | *sprA*[84,85] |
| *ndhF*[70] | *ycf* 遺伝子 |
| *ndhH*[65] | **ycf1*[86] |
| *ndhI*[65] | **ycf2*[86] |
| *ndhJ*[65,68,69] | *ycf5*（*ccsA*）[87] |
| *ndhK*[65,68,69] | *ycf10*（*cemA*）[88] |
| ATP 合成酵素 | 複製開始点 |
| *atpB* operon[71] | *oriA*[89] |
| Rubisco | **oriB*[89] |
| *rbcL*[41,72] | |

*は必須と思われる遺伝子．

脱水素酵素のサブユニットに相同なタンパク質をコードすると思われる遺伝子が葉緑体ゲノムに見つかり，シアノバクテリアの *ndhB* 変異株で光化学系 I サイクリック電子伝達が起こらないこと，また，シアノバクテリアと葉緑体の NDH 複合体が類似していたことから，葉緑体においても同様の機能を持つのではないかと考えられていた．そして，葉緑体 NDH 複合体が光化学系 I サイクリック電子伝達に関与することが実証されたのは，葉緑体形質転換により得られた *ndh* 遺伝子欠損株の解析からである[65,66,68]．この他，電子伝達系の複合体に含まれる低分子サブユニットの機能解析にも逆遺伝学的な手法が用いられている．

コピーのすべてを完全にノックアウトできない遺伝子は植物の生存に必須のものと考えられた．ATP 依存型 Clp プロテアーゼの触媒サブユニットの一つをコードする *clpP1* 遺伝子[73]，脂質の生合成に関与する *accD* 遺伝子[75]，リボソームタンパク質遺伝子[77–79] などのハウスキーピング遺伝子などがそれで，このうち *clpP1* 遺伝子については，別の研究によりその仮説の正しさが証明された[74]．また，*ycf1* 遺伝子や *ycf2* 遺伝子の完全なノックアウトは失敗に終わったことから，非常に重要な機能を持つタンパク質をコードしていると考えられた[86]．タバコ BY-2 培養細胞の色素体タンパク質のプロテオミクス解析から，Ycf1 タンパク質と Ycf2 タンパク質が実際に存在することが報告されたが[92]，それらの機能は依然不明である．

相同組換えによる方法とは別に，バクテリオファージ P1 に由来する CRE-*lox* 部位特異的組換えシステムを用いた葉緑体遺伝子のノックアウト法が報告されている[74]．この方法では，2 つの *lox* 配列で標識した葉緑体ゲノム上の領域を，核ゲノムへ導入した葉緑体移行シグナルを持つ CRE リコンビナーゼで切り出すことにより，ノックアウトする方法である（図 4）．この技術には葉緑体形質転換と核形質転換が必要になるが，CRE リコンビナーゼの発現を誘導型にすれば，目的の遺伝子を時期特異的または器官特異的にノックアウトし，その影響を調べることができる．これまで葉緑体以外での色素体遺伝子の機能の解析は進んでいないが，ここで紹介した方法は有用なツールになるかもしれない．ただし，*ycf1* や *ycf2* 遺伝子などは，このシステムを用いてノックアウトできたとしても，致死となる可能性が高いため解析が困難であることが予想される．完全なノックアウトを目指すのではなく，クラミドモナス葉緑体 *clpP* 遺伝子の研究で行われたように発現量を下げるような工夫が必要かもしれない[93]．

### 6.b.3.3　葉緑体遺伝子の改変

シアノバクテリアやクラミドモナスに比べ，タバコ葉緑体遺伝子に点変異を導入したという報告は非常に少ない．選択マーカーとして用いられた *rrn16* 遺伝子[10] と *rps12* 遺伝子[94] 以外では，*psbF* 遺伝子[95] と *rbcL* 遺伝子[96] に点変異を導入し，その影響を調べた研究があるくらいである．点変異ではないが，*rbcL* 遺伝子[97–99] や *rpoA* 遺伝子[100] を別の生物種由来の遺伝子と置換する形質転換が行われた．いずれの場合にも，タバコ本来の遺伝子産物とは機能的に置き換わらないようである．

これ以外に，葉緑体で機能する複合体を簡便かつ穏和な条件下で単離精製するために，その複合体に含まれるサブユニットにアフィニティー精製タグを付加することが行われた．Suzuki らは，葉緑体 *rpoA* 遺伝子にコードされる RNA ポリメラーゼ α サブユニットの C 末に

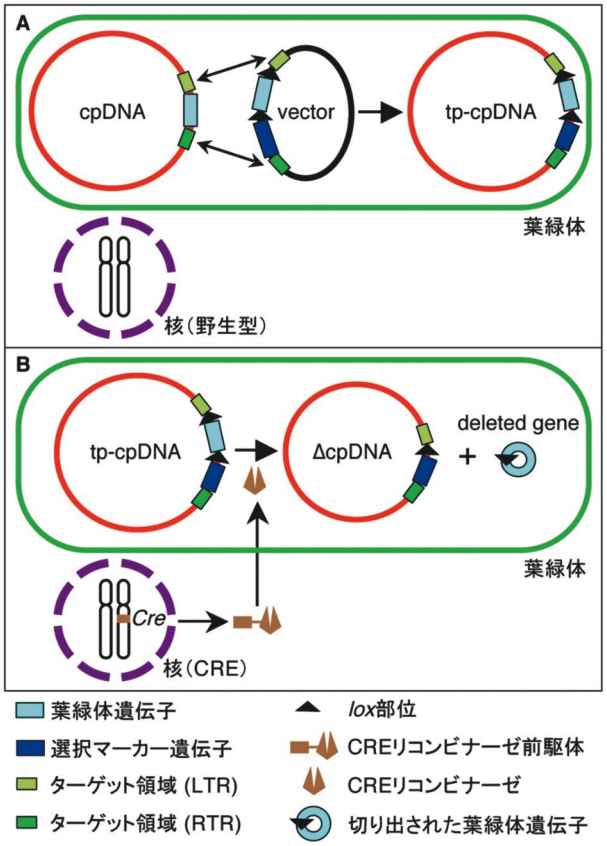



図4：CRE-*lox* 部位特異的組換えシステムを利用した葉緑体遺伝子のノックアウト法．A．まず，葉緑体形質転換により，目的の遺伝子を挟み込むように 2 つの *lox* 部位を導入する．B．その後，核へ CRE リコンビナーゼ遺伝子を導入した核形質転換体（♂）と交配することで，葉緑体形質転換体（♀）へ CRE 遺伝子を導入する．CRE リコンビナーゼは 2 つの *lox* 部位での組換えを引き起こし，そこに挟まれた領域を葉緑体ゲノムから排除する（ΔcpDNA＋deleted gene）．

His-tag を導入し，葉緑体形質転換体から原核型 RNA ポリメラーゼをアフィニティー精製した．そこには σ 因子は含まれていなかったが，コア・サブユニットの他に，機能の不明なタンパク質がいくつか含まれていることを明らかにした[101]．また，最近になって，葉緑体 *psbE* 遺伝子にコードされるシトクロム $b_{559}$ の α サブユニットに His-tag を導入し，光化学系 II をアフィニティー精製する方法が報告された[102]．葉緑体には多くの機能性複合体が存在しているが，その構造や組成はまだ完全に分かっている訳ではない．これまでの精製法では失われていたかもしれないサブユニットが，今後見つかってくるかもしれない．この方法はそのための強力なツールになると考えられる．

## 6.b.4　実験方法

葉緑体形質転換法は既に様々な文献で詳しく紹介されている[19,38,103]．葉緑体ゲノムを形質転換するためには，形質転換ベクターを葉緑体中へ導入しなければならない．そのための方法がいくつか報告されているが，パーティクルガンを用いて形質転換ベクターを細胞へ撃ち込むパーティクルデリバリー法が一般的である．この方法では，葉緑体形質転換ベクターでコーティングしたマイクロキャリア（タングステンまたは金粒子）を，ヘリウムガスを利用した空気銃の要領で，緑葉へ撃ち込み，葉緑体中へ形質転換ベクターを導入する（図 5）．

パーティクルデリバリー法以外には，ポリエチレングリコールを用いてプロトプラスト化した細胞へ形質転換ベクターを導入する方法[84]や顕微鏡下で形質転換ベク

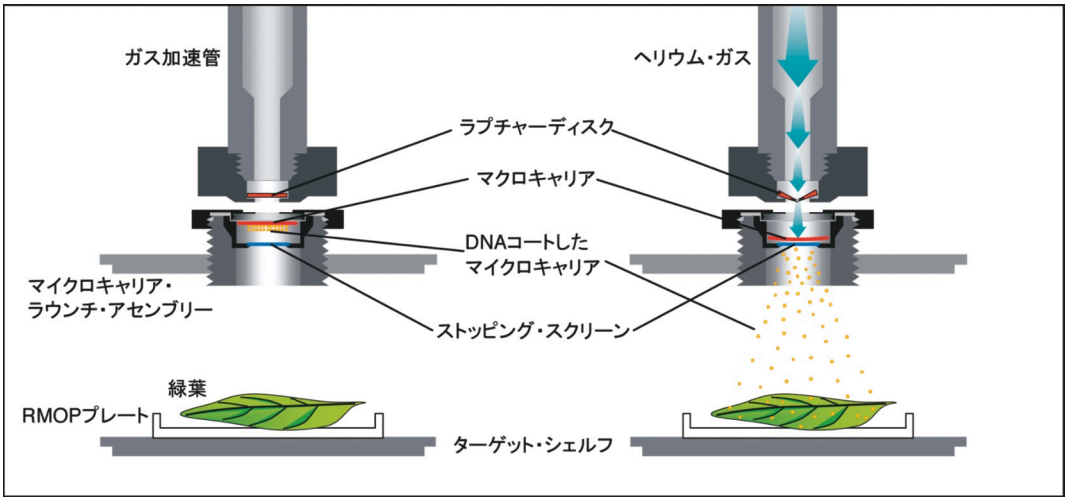



図5：パーティクルデリバリー法による葉緑体への形質転換ベクターの導入．ヘリウムガスを利用した遺伝子導入装置を用いて，ベクターDNA でコーティングしたマイクロキャリアを緑葉へ向けて撃ち込む．バイオ・ラッド・ラボラトリーズ社のご好意により提供していただいた図を改変した．

ターを葉緑体へ注入するマイクロインジェクションという方法がある[104]．前者の場合，高価な装置を必要としないが形質転換効率が低いという難点があるため，あまり用いられない[84]．後者の場合，この方法で導入されたDNAが葉緑体ゲノムへ組み込まれた安定な葉緑体形質転換体は得られていない[104]．本プロトコールではパーティクルガンを用いた葉緑体形質転換法を紹介する．

#### 6.b.4.1　葉緑体形質転換ベクター

葉緑体形質転換ベクターの基本形は，大腸菌で増やすための複製オリジンとアンピシリンなどに耐性を与える選択マーカー遺伝子を持ち，葉緑体DNA上のターゲット領域と葉緑体形質転換のための選択マーカー遺伝子を持つことである．ベクター・バックボーンとして，pUCベクターやpBluescriptベクターが用いられる．

##### 6.b.4.1.1　遺伝子発現を研究するためのベクター

葉緑体遺伝子発現系の研究のために，これまで多くのレポーター遺伝子を用いた研究が行われている．レポーター遺伝子としては，β グルクロニダーゼ(GUS)をコードする *uidA* 遺伝子やGFPなどの蛍光タンパク質をコードする遺伝子が用いられる[19]．レポーター遺伝子を挿入する場所の選択は非常に重要であり，レポーター遺伝子につないだ発現調節領域以外から転写が起こるような場所は避けるべきである．その目的に最も適していると考えられるのは，*trnV*-GAC遺伝子と3'*rps12*遺伝子の間の領域である[105]．この位置に挿入しても周囲の遺伝子発現の影響を受けにくい．一方，*rbcL* 遺伝子と *accD* 遺伝子間にレポーター遺伝子を挿入した場合，レポーター遺伝子は自身のプロモーターからだけではなく，*rbcL* プロモーターからも転写される．そのためにレポーター遺伝子につないだ制御配列に依存しない発現が起こるため，この目的には適していない[21]．

##### 6.b.4.1.2　外来遺伝子発現のためのベクター

医学的に重要な組換えタンパク質，除草剤や害虫に抵抗性を与えるタンパク質，代謝系を改変するようなタンパク質を葉緑体で合成する目的で，葉緑体ゲノムへの外来遺伝子の導入が行われている[19,38–40]．これまで葉緑体ゲノム上の様々な位置への挿入が報告されており，レビューにもまとめられている[38,39]．大きいものでは，約50 kbのDNAの挿入が報告されている[106]．多くの場合，フィールドへ出すことが前提になっているため，選択マーカー遺伝子を除いた形質転換体を作る動きが出ている．そのため，形質転換後にマーカー遺伝子を取り除くための方法がいくつか報告されている[82,107]．また，異常な表現型を持つ Δ*ycf3*，Δ*petA*，Δ*rpoA* 株へ形質転換することで，マーカー遺伝子を持たない葉緑体形質転換体を得る方法も報告されている[48]．この方法では，相同組換えにより正常な遺伝子を導入することで，正常な表現型をもつ植物体になることを形質転換成功の指標としている．

##### 6.b.4.1.3　葉緑体遺伝子をノックアウトするためのベクター

特定の葉緑体遺伝子をノックアウトする場合，葉緑体ゲノム配列を基にノックアウトする領域とターゲット領域を決める．大抵の場合，ノックアウトしたい遺伝子の代わりに選択マーカー遺伝子を挿入したベクターを構築する．この場合にも，効率の良い相同組換えのためには，ターゲット領域は左右それぞれ少なくとも1 kbあることが望ましい．また，マーカー遺伝子の挿入場所と向きは，周辺の遺伝子発現に影響を及ぼさないように決めなければならない．

##### 6.b.4.1.4　葉緑体遺伝子へ変異や精製タグを導入するためのベクター

変異を導入したい遺伝子が決まったら，まず，葉緑体ゲノム配列を基にターゲット領域を決める．次に，選択マーカー遺伝子の挿入場所を決める．ベクターの設計の際の注意点は，ノックアウトのときと同様である．変異を導入する部位がマーカー遺伝子から離れている場合，マーカー遺伝子だけが導入され，目的の変異が導入されないことがある．ターゲット領域内ではどの領域でも相同組換えが起こる可能性があるためで[94,108]，なるべくたくさんの形質転換体を得て，目的の変異が導入された個体を選ぶ必要がある．また，変異を導入する際に，その周辺の塩基配列に新しい制限酵素切断部位ができるように設計すれば，形質転換体を得た時にサザン解析で野生株と区別しやすくなる[96]．

目的のタンパク質にアフィニティー精製のためのタグを導入する場合，C末側に付加した方がよいと思われる．N末側へ導入すると翻訳開始効率が低下し，結果として目的のタンパク質の蓄積量に影響を及ぼす可能性があるためである．また，Rubisco大サブユニットにHis-tagを導入した葉緑体形質転換体の亜鉛含有量が増加したという報告がある[109]．His-tagの導入が代謝系に影響を及ぼす可能性は否定できない．したがって，目的に応じて別のタグの使用も考慮に入れる必要がある[110]．

##### 6.b.4.1.5　選択マーカー遺伝子と阻害剤

葉緑体形質転換体を得るためには，植物の再分化の際に何らかの手段を用いて選択圧をかける必要がある．通常用いられるのは，葉緑体遺伝子発現を阻害する抗生物質である．植物の代謝経路に影響を及ぼす除草剤も使用例がある．表2，表3に，これまでに報告されているタバ

**表2**：選択マーカー遺伝子と阻害剤

| 選択マーカー遺伝子 | 阻害剤 |
|---|---|
| *rrn16*（点変異）[11] | スペクチノマイシン／ストレプトマイシン |
| *aadA*[11] | スペクチノマイシン／ストレプトマイシン |
| *nptII*[111] | カナマイシン |
| *aphA-6*[112] | カナマイシン |
| BADH[113] | ベタイン・アルデヒド |

コ葉緑体形質転換に用いられた選択マーカーと阻害剤を示す．

タバコ葉緑体形質転換に用いられた最初の選択マーカーは，スペクチノマイシン（およびストレプトマイシン）に耐性を与える変異を導入した *rrn16* 遺伝子である[10]．スペクチノマイシンは葉緑体の 30 S リボソームに結合し，ペプチド転移反応を阻害するため，スペクチノマイシン存在下では植物は生長できない．この選択マーカーを用いた場合，形質転換が可能なゲノム上の位置が限定される．Carrer らにより報告された 2 種類の異なる形質転換ベクターを同時に導入する方法[114] に利用できるかもしれないが，一般的には抗生物質を不活性化することで耐性を与える選択マーカーを用いる．

現在最もよく用いられている選択マーカーは *aadA* 遺伝子である．この遺伝子産物であるアミノグリコシド-3″-アセチル転移酵素は抗生物質ストレプトマイシンとスペクチノマイシンを不活性化する．そのため，*aadA* 遺伝子の導入された植物細胞はスペクチノマイシンを含む再分化培地で耐性を示し，葉緑体形質転換体を選抜することができる[11]．また，緑色蛍光タンパク質をコードする *gfp* 遺伝子と *aadA* 遺伝子を融合させた Flare-S（Fluorescent antiboitic resistance gene-Spectinomycin）を用いて得られた葉緑体形質転換体では，GFP の蛍光を追跡することで，形質転換した細胞とそうでない細胞が分離する過程を観察することができる[115]．

カナマイシンに対する耐性を与える *nptII* 遺伝子を利用した葉緑体形質転換も報告されている[111,116]．カナマイシンは翻訳開始阻害剤であり，*nptII* 遺伝子産物であるネオマイシンホスホトランスフェラーゼII（NPTII）がカナマイシンを不活性化するため，選択培地上では形質転換した細胞のみ増殖できる．また，*nptII* 遺伝子とは別に，カナマイシンなどのアミノグリコシド系の抗生物質に耐性を与える *aphA-6* 遺伝子の使用も報告されている[112]．この遺伝子産物であるアミノグリコシド・ホスホトランスフェラーゼは NPTII よりも効率よくカナマイシンを不活性化するため，*nptII* 遺伝子を用いたときよりも形質転換効率が良いようである．ただし，カナマイシンには副作用があるらしく，*nptII* 遺伝子の発現量を増やしても形質転換効率はあまり高くならない．*nptII* 遺伝子や *aphA-6* 遺伝子により不活性化できる副作用の少ない抗生物質が見つかれば，葉緑体形質転換効率が高くなるかもしれない．

抗生物質を必要としない選択マーカーとして，BADH 遺伝子が報告されている[113]．この遺伝子産物であるベタイン・アルデヒド脱水素酵素は，毒性のあるベタイン・アルデヒドを不活性化するため，この薬剤を含む選択培地で葉緑体形質転換体が選抜される．スペクチノマイシンを用いたときよりも形質転換効率が高いらしい．

この他に，グリホサートに耐性を与える EPSPS 遺伝子，ビアラフォスに耐性を与える *bar* 遺伝子やピリミジニルカルボキシ系除草剤に耐性を与える変異型 ALS 遺伝子などを導入した葉緑体形質転換体は薬剤耐性を示すが[117–119]，これらの遺伝子を選択マーカーとして使って葉緑体形質転換体を得たという報告は今のところない．

植物の再分化には長い時間がかかるため，阻害剤は室温で数ヶ月間安定でなければならない．また，スペクチノマイシンのような副作用のない（または少ない）阻害剤を用いることが重要である．余談になるが，イネは元々スペクチノマイシンに耐性であり，葉緑体形質転換にスペクチノマイシンによる選抜を行うことができない[115]．スペクチノマイシン感受性のイネ変異株を得られれば，イネ葉緑体形質転換は容易になるかもしれない．

#### 6.b.4.1.6　ベクター構築の際の注意点など

ホモプラストミックな葉緑体形質転換体が得られるまで数ヶ月間を要する．もし，ベクターの設計に問題があったと判明した場合，それまでの労力と時間が無駄になるかもしれない．そのため，ベクターの設計には十分な時間をかけ，念入りに行うべきある．

葉緑体形質転換では相同組換えにより遺伝子を導入するため，基本的には葉緑体ゲノムのどの領域へも形質転換が可能である．ただし，葉緑体遺伝子発現を阻害したり，遺伝子をノックアウトするような部位への挿入は避けるべきである．

選択マーカー遺伝子の発現のために，通常は葉緑体由来のプロモーター，5’ 非翻訳領域，3’ 非翻訳領域を用いる．この時，マーカー遺伝子のコード領域の 5’ 側と 3’ 側につなげる DNA 配列は同じ遺伝子由来にしない方が良い．たとえその領域短くても，予期せぬ領域で相同組換えが起こったり，葉緑体内在性遺伝子がノックアウトされてしまう可能性がある[11,49]．また，葉緑体由来の 5’ 非翻訳領域から発現するマーカー遺伝子を葉緑体ゲノムへ

導入した時，葉緑体内在性遺伝子の発現が阻害される場合があるので，注意が必要である[27,120]．

組換えタンパク質を発現させるためのベクターを構築する過程で，大腸菌が正常に増殖しないことがある．その原因の一つとして考えられるのは，葉緑体と同様に原核型の遺伝子発現系をもつ大腸菌において組換えタンパク質が大量発現してしまうことである．この場合，目的のベクターが構築できなかったり，葉緑体形質転換に用いるDNAの調製が困難になるため，コピー数の少ないベクターをバックボーンとして用いたり，大腸菌を低温（室温以下）で培養するなどの工夫が必要である．また，目的の組換えタンパク質が大腸菌にとって有害な場合があるが，葉緑体において翻訳開始がRNAエディティングに依存する*psbL*遺伝子や*ndhD*遺伝子の5'非翻訳領域を用いることで問題を回避できるかもしれない[107]．大腸菌ではRNAエディティングが起こらないからである．

## 6.b.5　形質転換に用いるタバコの生育

### 6.b.5.1　タバコの種類と生育条件

実験用タバコの栽培品種のうち，葉緑体形質転換にはPetit HavanaやXanthiが用いられている．葉緑体形質転換には培養室かグロース・チャンバーで25–26°Cで16時間明条件／8時間暗条件下，無菌的に生育させたタバコを用いる．

### 6.b.5.2　培地

無菌的にタバコを生育する際，RM寒天培地が用いられる．これは，Murashige-Skoog培地に3％ショ糖と0.75％アガーを加えたものである．種子発芽用には40–50 mlの寒天培地を厚めのシャーレに入れたものを用意し，植物育成用には40–50 mlの寒天培地の入ったマジェンタ・ボックスを用意する．アガーの種類やオートクレーブの条件（加温・冷却にかかる時間）により，同じ濃度でも寒天培地の固さが変わる．従って，研究室ごとにアガー濃度を決定する必要がある．通常は0.6–0.8％内に収まるはずである．市販のMurashige-Skoog培地用の粉末を用いても良いが，メーカーごとに品質が異なるようなので注意を要する．もしオートクレーブ後に濁りを生じるならば，その使用は避けた方が良い．

### 6.b.5.3　種子の殺菌処理およびRM培地への播種

タバコの場合，シードポッド内は無菌のため，殺菌せずに播種する人もいるが，通常はカビやバクテリアの繁殖を抑えるために殺菌処理を行う．作業はクリーンベンチ内で行う．エタノールや次亜塩素酸処理の時間が長すぎると発芽率が大幅に低下するので注意を要する．RM培地への播種後，培養室またはグロース・チャンバーへ置き，2週間ほど生育させる．

**表3**：10 x macro 水溶液（1,000 ml）

| 試薬 | 1,000 mlあたり加える量 |
|---|---|
| $KNO_3$ | 19.0 g |
| $MgSO_4 \cdot 7\,H_2O$ | 3.7 g |
| $CaCl_2 \cdot 2\,H_2O$ | 4.4 g |
| $KH_2PO_4$ | 1.7 g |
| $(NH_4)NO_3$ | 16.5 g |

**表4**：100 x micro 水溶液（100 ml）

| 試薬 | 100 mlあたり加える量 |
|---|---|
| $MnSO_4 \cdot 2\,H_2O$ | 169.0 mg |
| $H_3BO_3$ | 62.0 mg |
| $ZnSO_4 \cdot 7\,H_2O$ | 86.0 mg |
| KI | 8.3 mg |
| $Na_2MoO_4 \cdot 2\,H_2O$（1 mg/ml） | 2.5 ml |
| $CuSO_4 \cdot 5\,H_2O$（1 mg/ml） | 0.25 ml |
| $CoCl_2 \cdot 6\,H_2O$（1 mg/ml） | 0.25 ml |

**表5**：RM寒天培地

| ストック溶液・試薬 | 1,000 mlあたり加える量 |
|---|---|
| 10 x macro 水溶液 | 100 ml |
| 100 x micro 水溶液 | 10 ml |
| 1% Fe-EDTA（Sigma E6760） | 5 ml |
| ショ糖 | 30 g |
| アガー（植物組織培養用） | 7.5 g |

KOHでpH 5.6–5.8に調整する．
1% Fe-EDTAは水に溶解後，濾過滅菌し，冷暗所で保存する．

#### 6.b.5.3.1　用意するもの

- 滅菌水：約10 mlをバイアルなどの小さな容器に入れたものを5本程度用意しておくと良い．
- 70％エタノール
- 5％次亜塩素酸／0.1％ Tween 20水溶液
- 滅菌済みのマイクロチューブとピペットマン用のチップ
- 滅菌済みのパスツールピペット（脱脂綿などを詰めてオートクレーブにかける）
- RM寒天培地／10-cmシャーレを数枚
- サージカルテープ．

#### 6.b.5.3.2　殺菌処理の手順

1．1.5 mlのマイクロチューブへ種子を入れる（100〜200個）．
2．70％エタノールを1 ml加え，3分間置く．

3．軽く遠心したあと，上清を捨てる．
4．次亜塩素酸／Tween 20 水溶液を 1 ml 加え，1 分間置く．
5．軽く遠心したあと，上清を捨てる．
6．1 ml の滅菌水 1 ml で 3-5 回洗浄する．
7．最終的に，1 ml の滅菌水に種子を懸濁する．

#### 6.b.5.3.3　播種の手順

1．RM 寒天培地上に滅菌水を 2 ml 程度注ぎ，培地全体に行き渡らせる．
2．殺菌処理した種子を 100 個程度含む懸濁液をパスツールピペットで RM 寒天培地上に載せ，種を培地全体に行き渡らせる．
3．培地上の余分な滅菌水を捨てる（パスツールピペットまたはピペットマンで）．
4．シャーレのふたを閉じ，サージカルテープを巻く．
5．培養室またはグロース・チャンバーへ置き，2 週間ほど生育させる．

### 6.b.5.4　タバコの植え継ぎと育生

播種後，約 2 週間ほどで RM 寒天培地の入ったマジェンタ・ボックスへ移植できる段階になる（マジェンタ・ボックスはシグマ社から入手可能）．作業はクリーンベンチ内で行う．

#### 6.b.5.4.1　用意するもの

・RM 寒天培地（40-50 ml）/マジェンタ・ボックス GA7
・滅菌済みのピンセット
・サージカルテープ

#### 6.b.5.4.2　手順

1．シャーレで育てた実生をピンセットで傷つけないように採り，マジェンタボックス中の RM 寒天培地に移植する．
2．シャーレのふたをした後，サージカルテープを巻き，培養室で育てる．

## 6.b.6　葉緑体形質転換

### 6.b.6.1　RMOP 寒天培地および RMOP/Spec 寒天培地の準備（シューティング前日）

1 種類の形質転換ベクターにつき 20-30 ショット行う．そのために直径 10 cm の薄いバクテリア用プレートに約 10 ml の RMOP 寒天培地を入れたものを 20-30 枚用意する．また，シューティング後の形質転換体の選抜のため，500 μg/ml スペクチノマイシン（塩酸塩）を含む RMOP（RMOP/Spec）寒天培地 40-50 ml を厚めのシャーレに入れたものを 100 枚ほど用意する．滅菌はオートクレーブにより行う．スペクチノマイシンはオートクレーブ後，表 6 の RMOP 培地が 50°C以下に冷めてから加える．

### 6.b.6.2　葉の準備（シューティング前日）

3-6 週間生長させた植物から緑葉を切り出す．全体が均一に緑色で，なるべく丸い形の葉を用いる．細長い葉は花芽形成が近い状態なので，形質転換には用いない．作業はクリーンベンチ内で行う．

#### 6.b.6.2.1　用意するもの

・滅菌済みのピンセット
・滅菌済みのメス
・滅菌済みの濾紙（直径 10 cm のシャーレに載る大きさのもの）
・RMOP 寒天培地（バクテリア用シャーレに約 10 ml 注ぎ込む）

#### 6.b.6.2.2　手順

1．RMOP 寒天培地上にオートクレーブで滅菌した濾紙を一枚のせ，その上に葉を逆さまにして置く（葉の

**表 6**：RMOP 寒天培地（必要に応じて抗生物質を加える）

| ストック溶液・試薬 | 1,000 ml あたり加える量 |
|---|---|
| 10 x macro 水溶液 | 100 ml |
| 100 x micro 水溶液 | 10 ml |
| 1% Fe-EDTA（Sigma E6760） | 5 ml |
| ショ糖 | 30 g |
| 1 mg/ml thiamine | 1 ml |
| 1 mg/ml NAA*（0.1 M NaOH に溶解） | 0.1 ml |
| 1 mg/ml BAP**（0.1 M HCl に溶解） | 1 ml |
| Myo-inositol | 0.1 g |
| アガー（植物組織培養用） | 7.5 g |
| 100 mg/ml スペクチノマイシン，塩酸塩 | 500 μl |
| 100 mg/ml ストレプトマイシン，硫酸塩 | 500 μl |

KOH で pH 5.6-5.8 に調整する．
*NAA：1-Naphthaleneacetic acid（ナフタレン酢酸；オーキシン）
**BAP：N6-Benzylamino purine（ベンジルアミノプリン；サイトカイニン）

表側が濾紙に接するように置く).

2．濾紙の上に葉をのせ，葉脈などに切れ目を入れ，葉全体が培地に触れるようにする．葉に切れ目を入れるのを躊躇してはならない．小さな葉を用いる場合，1シャーレあたり2-3枚の葉をのせても構わない.なお，濾紙はシューティング時に寒天培地が飛び散らないようにするためのものである．

3．シャーレのふたを閉じる．サージカルテープを巻く必要はない．

4．必要な枚数用意できたら，シャーレの入っていた無菌のビニール製のバッグに入れ,培養室に置いておく．

### 6.b.6.3 マイクロキャリア（タングステンまたは金粒子）の準備（シューティング前日）

形質転換ベクターを葉緑体へ導入するためのマイクロキャリアとして，タングステン粒子（直径1.1 $\mu$m）または金粒子（直径0.6 $\mu$m）が用いられている．最近では高価ではあるが金粒子の使用が主流になっている．マイクロキャリアを洗浄する作業はクリーンベンチ内で行う．なお，この作業はシューティング当日に行っても構わない．

#### 6.b.6.3.1 用意するもの

・マイクロキャリア
・スクリューキャップ付きのマイクロチューブ
・無水エタノール
・滅菌水
・ソニケーター
・超音波処理のための容器（微量超遠心用の厚手のポリプロピレンチューブなど）

#### 6.b.6.3.2 手順

1．100ショットあたり50 mgのマイクロキャリアを用意する．

2．1.5-mlのマイクロチューブへ入れ,無水エタノールを1 ml加える．

3．95℃で2時間処理し,マイクロキャリアを洗浄する．

4．軽く遠心し，マイクロキャリアを沈殿させる．

5．上清を捨て，沈殿を無水エタノールに懸濁する．

6．適当な容器へ移し，超音波処理を施す．5分間の処理を3回行う．

7．超音波処理後，マイクロキャリア懸濁液を1.5-mlのマイクロチューブへ移す．

8．軽く遠心する．

9．上清を捨て，沈殿を滅菌水1 mlに懸濁する．この作業を3回繰り返す．

10．沈殿を1 mlの滅菌水に懸濁する．

11．フリーザーで冷凍保存する（シューティング前日に用意する場合のみ)．

### 6.b.6.4 マイクロキャリアのDNAコーティング（シューティング当日）

形質転換ベクターDNAでマイクロキャリアをコーティングする．1ショットあたり5 $\mu$lのDNAコートしたマイクロキャリア懸濁液が必要である．$CaCl_2$とスペルミジン存在下でマイクロキャリアをコーティングした後，無水エタノールで洗浄する．無水エタノールを用いることで，DNAコートしたマイクロキャリアがサラサラな状態になり，マクロキャリアに載せたときにきれいに均一に広がる．マイクロチューブ内でサラサラな状態になるまで無水エタノールでの洗浄を繰り返す．

#### 6.b.6.4.1 用意するもの

・洗浄済みのマイクロキャリア懸濁液
・形質転換ベクターDNA（$T_{10}E_1$緩衝液に溶解し，濃度は1 $\mu$g/$\mu$l以上）
・2.5 M $CaCl_2$
・0.1 Mスペルミジン（free base）
・無水エタノール
・マイクロチューブ

#### 6.b.6.4.2 手順

1．1.5-mlのマイクロチューブを氷上に置き,以下のものを順に混合する（6ショット分)．

| | |
|---|---|
| マイクロキャリア懸濁液 | 50 $\mu$l |
| 形質転換ベクターDNA | 10 $\mu$g |
| 2.5 M $CaCl_2$ | 50 $\mu$l |
| 0.1 M　スペルミジン（free base） | 20 $\mu$l |

2．低温室で30分間ボルテックスミキサーにかける．

3．200 $\mu$lの無水エタノールを加え，よく混ぜる．

4．軽く遠心にかける．

5．上清を除き，沈殿を200 $\mu$lの無水エタノールによく懸濁する．

6．軽く遠心にかける．

7．5-6の操作を少なくとも3回繰り返す．

8．最終的に沈殿を30 $\mu$lの無水エタノールに懸濁する．

### 6.b.6.5 パーティクルデリバリー（シューティング）

遺伝子導入装置PDS-1000/He（図6）をクリーンベンチ内に設置する．そのため，作業はクリーンベンチ内で行うことになる．

#### 6.b.6.5.1 装置など

・Bio-Rad PDS-1000/Heシステム
・真空ポンプ
・ヘリウム・ガス・ボンベ
・クリーンベンチ




図 6：遺伝子導入装置 PDS-1000/He. 写真はバイオ・ラッド・ラボラトリーズ社のご好意により提供していただいた.

### 6.b.6.5.2　1 ショット当たり必要なもの

・ラプチャーディスク 1,100 psi　　1 枚
・マクロキャリア　　1 枚
・ストッピングスクリーン　　1 枚
・マクロキャリアホルダー　　1 個

これらを無水エタノールで滅菌し，クリーンベンチ内で乾燥させる．滅菌済みのシャーレ上で行うとよい．また，PDS-1000/He の真空チャンバー内を 70%エタノールで消毒し，乾燥させる．葉緑体形質転換においては，カビが大敵である．植物の再分化には 3 週間以上を要するが，その間無菌状態が保たれていなければならない．従って，非常に清潔な環境で作業を行わなう必要がある．機器の詳しい取り扱い方についてはその取扱説明書を参照のこと．

### 6.b.6.5.3　手順

1．遺伝子導入装置 PDS-1000/He のメインスイッチを入れる．
2．付属の真空ポンプのスイッチを入れる．
3．ヘリウム・ガス・ボンベのバルブを開く．この時，圧力が少なくとも 1,300 psi 以上でなければならない．
4．マクロキャリアホルダーを 5 枚を用意し，それぞれにマクロキャリアを装着する（滅菌済みのシャーレ上で行うとよい）．
5．DNA コートしたマイクロキャリアをよく懸濁する．マクロキャリア 1 枚当たり 5 μl をアプライし，乾燥させる．この時，DNA コートしたマイクロキャリアはマクロキャリア上にきれいに広がるはずである．そうならない場合には，水分を完全に除去できていないということなので，DNA コートしたマイクロキャリアを再度無水エタノールで洗浄する．
6．ラプチャーディスク・ホルダーにラプチャーディスクを装着する．
7．真空チャンバー内にホルダーをしっかりと取り付ける．
8．フライングディスク・ホルダーにストッピングスクリーンをのせ，その上にマクロキャリアホルダーを取り付ける．ステージの位置は上から 1 番下または下から 2 番目のスロットである．
9．葉をのせたシャーレの蓋を外し，ステージにのせる．真空チャンバーの扉を閉める．
10．真空ボタンを入れ，チャンバー内の圧力が少なくとも〝25 inches of Hg〟に達するまで待つ（10 数秒かかる）．
11．シューティングボタンを押し続ける．圧力が 1,100 psi に達したら，ラプチャーディスクが破れ，DNA コートしたマイクロキャリアが発射される．この時点でシューティングボタンを放す．圧力ボタンのセッティングを変え，チャンバー内を真空状態から復帰させる．
12．真空チャンバーからシャーレを取り出し，蓋を被せる．
13．すべての葉をシューティングし終わったら，再び無菌のビニール袋に入れ，培養室またはグロース・チャンバーに 2 日間静置する．時間が経つと，マイクロキャリアが撃ち込まれた部分はメタリック色に見えてくるはずである．

### 6.b.6.6　再分化培地への移植

シューティング後，2 日間置くことで葉緑体中での *aadA* マーカー遺伝子の発現を促す．シューティング後すぐに再分化培地へ移すと，培地中のスペクチノマイシンが *aadA* 遺伝子の発現を阻害するため，すべての葉緑体がスペクチノマイシンを不活性化できず，植物が再分化できない．作業はクリーンベンチ内で行う．

### 6.b.6.6.1　用意するもの

・滅菌済みのピンセット
・滅菌済みのメス
・RMOP/Spec 寒天培地

### 6.b.6.6.2　手順

1．シューティングした葉を約 1 $cm^2$ くらいの大きさに切り分け，RMOP/Spec 寒天培地上に葉の裏側を上に向けて載せる．寒天培地になじむように，しっかりと

押さえつける．プレート一枚当たり 8 片程度にする．
2．しっかりとラッピングし，培養室かグロース・チャンバーに移す．スペクチノマイシン耐性のシュートが出てくるまで待つ．

## 6.b.7　植物の再分化と葉緑体形質転換体の評価

葉緑体形質転換が成功していれば，3-4 週間ほどで再分化したシュートを見ることが出来る．新しい再分化植物の出現は再分化の開始から 2 ヶ月ほど続く．再分化した植物体の多くは葉緑体形質転換体であるが，*16* 遺伝子への突然変異によるスペクチノマイシン耐性株も出現する．また，導入した DNA が核ゲノムへ組み込まれることもあるため，葉緑体形質転換体を正しく選抜する必要がある．

### 6.b.7.1　再分化，継代培養，種子形成のアウトライン

1．最初のシュートを切り刻み，新しい RMOP/Spec 寒天培地で再分化を開始する．
2．3-4 週間後，再分化したシュートを切り刻み，新しい RMOP/Spec 寒天培地へ移植する．また，突然変異体と区別するために，RMOP/Spec/Str 寒天培地にも移植する．
3．3-4 週間後，再分化したシュートを RM 寒天培地に移植し，発根させる（シャーレ）．
4．発根し，葉が大きくなったら，葉から DNA を抽出し，サザン解析や PCR 解析を行う．
5．再分化した植物が目的のホモプラストミックな形質転換体であれば，植物をマジェンタ・ボックスの RM 寒天培地に植えかえ，さらに大きく育てる．
6．土壌へ植えかえ，種子を形成させる．

### 6.b.7.2　抗生物質による葉緑体形質転換体の評価

シューティング後に再分化したシュートが大きくなってきたら，細かく切り分けて，新しい RMOP/Spec 寒天培地に移植する．これと同時に，RMOP/Spec/Str 寒天培地（表 6 を参照）にも移植し，培養する．もし，再分化した植物が目的の葉緑体形質転換体であれば，ストレプトマイシンを含む培地上で緑色のカルスを形成するはずである．*aadA* 遺伝子が導入されたタバコはストレプトマイシンにも耐性となるからである．スペクチノマイシン耐性の 16 S rRNA 変異株はストレプトマイシン耐性とはならない．そのため，葉緑体形質転換体と突然変異体を容易に区別することが出来る．

3 週間ほどすると，多数の新しい再分化したシュートが出現する．今度は細かく切り分けず，茎のところで切り，発根を促すために RM 培地に移植する．サザン解析や PCR 解析を行うため，少なくとも 4 個体を植えつぐ必要がある．

### 6.b.7.3　サザン解析や PCR 解析による葉緑体形質転換体の評価

シュートが発根し適当な大きさになったら，葉から DNA を抽出し，サザン解析や PCR 解析を行う．これにより，すべての葉緑体 DNA が置き換わっていることを確認する．これらの解析法は広く行われているので，ここでは簡単に触れるにとどめておく．

サザン解析の場合，CTAB 法などにより調製した DNA を適当な制限酵素で切断し，マーカー遺伝子およびターゲット領域に相補的な 2 種類の異なるプローブを用いて別々にハイブリダイゼーションを行う．注意しなければならない点は，ターゲット領域の外側で切断する制限酵素を用いることである（一方が外側で，もう一方が内側でも良い）．ターゲット領域の内側で切断する制限酵素を用いると，ベクターが葉緑体ゲノムのどこに挿入されても同じシグナルが得られてしまうからである．また，野生株と葉緑体形質転換体を明確に区別できるように切断する制限酵素を選択する．

ゲノム解析から，核ゲノムにも葉緑体 DNA が挿入されていることが報告されている．そのため，葉全体から抽出した DNA の解析では，ホモプラストミックな葉緑体形質転換体かどうかの判定が難しいことがある[121]．単離葉緑体から DNA を抽出するか，パルス・フィールド・ゲル電気泳動で葉緑体 DNA を分離してから PCR により検定することで，その問題を回避できる[88]．

## 6.b.8　継代培養と種子形成

RM 寒天培地の入ったマジェンタ・ボックスへ移し，形質転換体を生育させる．また，土へ植えかえ，種子を形成させる．マジェンタ・ボックスで生育させた植物体を土へ植えかえるとき，根に付着した RM 寒天培地をよく洗い流さなければならない．栄養分を含む培地が残ると，カビやバクテリアが繁殖し，根の発達に悪影響を及ぼすからである．土へ植えかえたあとは，植物をサランラップなどで軽く覆い，数日から一週間くらいは出来るだけ湿度を保つようにする．

## 6.b.9　交配とシード・アッセイによる葉緑体形質転換体の評価

サザン解析や PCR 解析では，再分化した個体の一部

分しか調べないため，個体全体としてはホモプラストミックな形質転換体となっていない可能性が残っている．また，葉緑体ゲノムだけでなく，核ゲノムへも選択マーカー遺伝子が挿入している可能性もあるため[122]，得られた種子を抗生物質を含む培地上で発芽させることで，ホモプラストミックな葉緑体形質転換体かどうかを判定しなければならない．そのために，自家受粉によりえられる種子とは別に，野生株との交配による種子を得る必要がある．

#### 6.b.9.1　交配方法

##### 6.b.9.1.1　用意するもの

・ピンセット（使用前に 70%エタノールで洗浄する）
・グラシン紙などで作った小さな袋
・付け札

##### 6.b.9.1.2　手順

1．開花直前のつぼみを選び，花の一部にピンセットで切れ目を入れる．
2．つぼみの中の 5 本の雄しべをすべて取り除く．
3．他の個体から採取した花粉を雌しべに塗り付ける．
4．グラシン紙製の袋をかけ，開花後に受粉が起こらないようにする．
5．付け札に，どの組み合わせで交配を行ったかを記入し，花に引っ掛けておく．

#### 6.b.9.2　シード・アッセイ

マーカー遺伝子として *aadA* 遺伝子を用いた場合には，500 μg/ml スペクチノマイシンを含む RM 培地上で，*nptII* を用いた場合には，200 μg/ml カナマイシン（硫酸塩）を含む RM 培地上で発芽させる（表 5 を参照）．抗生物質としてカナマイシンを用いる場合，種子の洗浄に使用する滅菌水にあらかじめ 200 μg/ml カナマイシンを加えておく必要がある．カナマイシンを含む RM 寒天培地上で発芽した時，子葉がグリーンになることがあるからである．ただし，カナマイシンに耐性を示さない場合，本葉は形成されないため，形質転換体と野生株を区別することは可能である．

#### 6.b.9.3　自家受粉により得られた種子の場合

ホモプラストミックな形質転換体を自家受粉させた場合(タバコは基本的に自家受粉する)，得られた種子から発芽した芽生えはすべて RMOP/Spec 寒天培地上でグリーンになるはずである．白い個体があれば，葉緑体形質転換体はホモプラストミックではないということになる．

#### 6.b.9.4　形質転換体（♀）と野生株（♂）の交配により得られた種子の場合

被子植物の葉緑体は基本的に母性遺伝するため，RMOP/Spec 寒天培地上では芽生えはすべてグリーンになるはずである．白い個体が見られるようなら，葉緑体形質転換体はホモプラストミックではないということになる．

#### 6.b.9.5　野生株（♀）と形質転換体（♂）の交配により得られた種子の場合

芽生えはすべて白くなるはずである．もし RMOP/Spec 寒天培地上でグリーンの芽生えが多数見られるようなら，核ゲノムへも *aadA* 遺伝子が挿入した可能性がある．そのような場合には，「形質転換体（♀）と野生株（♂）の交配により得られた種子」の中から核ゲノムにマーカー遺伝子の挿入されていないものを選び出す必要がある．

### 6.b.10　トラブル・シューティング

再分化培地上で形質転換体が得られない場合，RMOP/Spec 培地などに問題がないかを確認する．抗生物質を含まない培地で野生株からの再分化が起こるかを調べればよい．

葉緑体機能を損ねるような変異を導入することで植物が異常な表現型を示したり，また，組換えタンパク質の大量発現により〝弱い〟形質転換体が得られることがある[123]．再分化した植物を良く観察し，異常な表現型の出現を見逃さないことが重要である（形質転換後，最初に出現した葉をよく見ると，緑と黄緑色の斑模様が観察できることがある．）．

再分化培地上で長期間組織培養を続けると，予期せぬ変異が入ることで植物が異常な表現型を示すことがある[121]．このようなことが起こると，目的の変異の導入による表現型と混同する恐れがある．もし核ゲノムへの変異による異常な表現型であれば，野生株との交配を繰り返すことで，問題を解決できるかもしれない．

雄しべが短すぎて自家受粉ができない形質転換体が得られることがある．このようになると花がぽろぽろと落ち，種子が形成されない．この場合には，野生株の花粉を用いて葉緑体形質転換体と交配させることで，問題を解決できることがある．また，ミトコンドリア DNA への変異のために雄性不稔が起こる可能性がある[124]．タバコなどの種子植物ではミトコンドリアは葉緑体と同様に母性遺伝するため，野生株との交配による正常化はできない．葉緑体ゲノムへの変異による優性不稔の可能性も報告されており[125]，このような変異が入った場合には，修正は不可能と思われる．このような問題が起こらないようにするためには，一つの形質転換について複数の形質

転換体を得て，それぞれを確実に評価することが重要である．

## 6.b.11 おわりに

タバコ葉緑体形質転換法の確立から約 20 年が経過し，これまでに基礎研究から応用研究まで非常に幅広く利用されてきた．しかしながら，被子植物の葉緑体形質転換は非常に手間がかかり，また，容易に形質転換できる植物種が非常に限られているため，光合成研究にはまだそれほど積極的に用いられていない．現状では，医学的，薬学的，工業的に有用な組換えタンパク質の生産や除草剤や害虫に抵抗性をもつ植物や代謝系を改変した植物を作出するなど応用分野で主に注目されている．

葉緑体形質転換法を用いた逆遺伝学的手法により，葉緑体遺伝子産物の機能が次々に明らかになってきたが，*ycf1*，*ycf2* などいまだに機能不明のものもあり，それらの解明は今後の課題である．もしかすると，非コード RNA[126,127] などの未知の遺伝子がまだ残っているかもしれない．また，クラミドモナスとは異なり，植物には分化した色素体が存在する．しかし，葉緑体以外の色素体でのプラスチド遺伝子の機能に関する研究はあまり進んでいない．葉緑体（色素体）形質転換法は，光合成研究を含めた葉緑体の研究だけでなく，他の色素体の研究にも利用できると思われる．これまでに作出された葉緑体遺伝子ノックアウト株やレポーター遺伝子を導入した形質転換がこの研究に用いられなかったのは非常に残念なことである．

葉緑体コードのサブユニットへ導入したタグを利用して超分子複合体をアフィニティー精製し，そこに新規のタンパク質やこれまでの方法で精製した標品には含まれていなかったサブユニットが確認された[101,102]．このことは，このアプローチの有効性の高さを示すものである．もし，複合体の単離精製の段階で失われたサブユニットがあるとすれば，その標品を用いた構造解析や活性測定に大きく影響を及ぼす可能性がある．今後，他の複合体でも，より生体内での存在状態に近い形で精製するために同様のアプローチが用いられるかもしれない．

実のところ，葉緑体形質転換体の設計と作出は出発点に過ぎず，一定の結論を得るためには様々な手法による形質転換体の詳細な解析が行われなければならない．タバコ葉緑体形質転換法は決して難しい技術ではないが，高価な装置を必要とするため，実際に形質転換を行える研究室は限られている．今後は多くのグループが連携して研究を進めることも必要になってくるであろう．本章で紹介したプロトコールが光合成研究の発展に役立つものとなれば幸いである．

**謝辞**

葉緑体ゲノム地図を提供していただいた名古屋市立大学の湯川真希，杉浦昌弘両氏および愛知学院大学の續伯彦氏に感謝いたします．また，遺伝子導入装置等の図を提供いただいた際にご協力いただきましたバイオ・ラッド・ラボラトリーズ社の平子俊行氏に厚く御礼申し上げます．

## 参考文献

1）R. R. Wise, The Structure and Function of Plastids, eds. R. R. Wise, & J. K. Hoober, Dordrecht, Springer, 2006, p.3.
2）K. Shinozaki, M. Ohme, M. Tanaka, T. Wakasugi, N. Hayashida, T. Matsubayashi, N. Zaita, J. Chunwongse, J. Obokata, K. Yamaguchi-Shinozaki, C. Ohto, K. Torazawa, B.-Y. Meng, M. Sugita, H. Deno, T. Kamogashira, K. Yamada, J. Kusuda, F. Takaiwa, A. Kato, N. Tohdoh, H. Shimada, & M. Sugiura, EMBO J. **5** (1986) p.2043.
3）M. Yukawa, T. Tsudzuki, & M. Sugiura, Plant Mol. Biol. Rep. **23** (2005) p.1.
4）K. Ohyama, H. Fukuzawa, T. Kohchi, H. Shirai, T. Sano, S. Sano, K. Umesono, Y. Shiki, M. Takeuchi, Z. Chang, S. Aota, H. Inokuchi, & H. Ozeki, Nature **322** (1986) p.572.
5）J. E. Boynton, N. W. Gillham, E. H. Harris, J. P. Hosler, A. M. Johnson, A. R. Jones, B. L. Randolph-Anderson, D. Robertson, T. M. Klein, K. B. Shark, & J. C. Sanford, Science **240** (1988) p.1534.
6）M. Goldschmidt-Clermont, Nucleic Acids Res. **19** (1991) p.4083.
7）H. Daniell, J. Vivekananda, B. L. Nielsen, G. N. Ye, K. K. Tewari, & J. C. Sanford, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **87** (1990) p.88.
8）G. N. Ye, H. Daniell, & J. C. Sanford, Plant Mol. Biol. **15** (1990) p.809.
9）J. M. Shaver, D. J. Oldenburg, & A. J. Bendich, Planta **224** (2006) p.72.
10）Z. Svab, P. Hajdukiewicz, & P. Maliga, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **87** (1990) p.8526.
11）Z. Svab, & P. Maliga, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **90** (1993) p.913.
12）S. Ruf, M. Hermann, I. J. Berger, H. Carrer, & R. Bock, Nat. Biotechnol. **19** (2001) p.870.
13）B. K. Hou, Y. H. Zhou, L. H. Wan, Z. L. Zhang, G. F. Shen, Z. H. Chen, & Z. M. Hu, Transgenic Res. **12**

(2003) p.111.
14) S. umar, A. Dhingra, & H. Daniell, Plant Physiol. **136** (2004) p.2843.
15) N. Dufourmantel, B. Pelissier, F. Garcon, G. Peltier, J.-M. Ferullo, & G. Tissot, Plant Mol. Biol. **55** (2004) p. 479.
16) C. L. C. Lelivelt, M. S. McCabe, C. A. Newell, C. B. de Snoo, K. M. P. van Dun, I. Birch-Machin, J. C. Gray, K. H. G. Mills, & J. M. Nugent, Plant Mol. Biol. **58** (2005) p.763.
17) S. Okumura, M. Sawada, Y. W. Park, T. Hayashi, M. Shimamura, H. Takase, & K. Tomizawa, Transgenic Res. **15** (2006) p.637.
18) S. Kumar, A. Dhingra, & H. Daniell, Plant Mol. Biol. **56** (2004) p.203.
19) H.-U. Koop, S. Herz, T. J. Golds, & J. Nickelsen, Cell and Molecular Biology of Plastids, ed. R. Bock, Berlin/Heidelberg, Springer, 2007, p.457.
20) J. M. Staub, & P. Maliga, EMBO J. **12** (1993) p.601.
21) J. M. Staub, & P. Maliga, Plant J. **6** (1994) p.547.
22) L. A. Allison, & P. Maliga, EMBO J. **14** (1995) p.3721.
23) P. Sriraman, D. Silhavy, & P. Maliga, Nucleic Acids Res. **26** (1998) p.4874.
24) J. Y. Suzuki, P. Sriraman, Z. Svab, & P. Maliga, Plant Cell **15** (2003) p.195.
25) F. Zhou, D. Karcher, & R. Bock, Plant J. **52** (2007) p. 961.
26) R. Bock, & P. Maliga, Nucleic Acids Res. **23** (1995) p. 2544.
27) S. Chaudhuri, H. Carrer, & P. Maliga, EMBO J. **14** (1995) p.2951.
28) S. Chaudhuri, & P. Maliga, EMBO J. **15** (1996) p.5958.
29) R. Bock, M. Hermann, & H. Kössel, EMBO J. **15** (1996) p.5052.
30) M. L. Reed, & M. R. Hanson, Mol. Cell. Biol. **17** (1997) p.6948.
31) M. Hermann, & R. Bock, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **96** (1999) p.4856.
32) M. L. Reed, N. M. Peeters, & M. R. Hanson, Nucleic Acids Res. **29** (2001) p.1507.
33) T. Shiina, L. Allison, & P. Maliga, Plant Cell **10** (1998) p.1713.
34) C. Eibl, Z. Zou, A. Beck, M. Kim, J. Mullet, & H.-U. Koop, Plant J. **19** (1999) p.333.
35) H. Kuroda, & P. Maliga, Plant Physiol. **125** (2001) p. 430.
36) K. Wostrikoff, & D. Stern, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **104** (2007) p.6466.
37) T. Shikanai, Cell. Mol. Life Sci. **63** (2006) p.698.
38) P. Maliga, Annu. Rev. Plant Biol. **55** (2004) p.289.
39) K. A. Lutz, A. K. Azhagiri, T. Tungsuchat-Huang, & P. Maliga, Plant Physiol. **145** (2007) p.1201.
40) D. Verma, & H. Daniell, Plant Physiol. **145** (2007) p. 1129.
41) I. Kanevski, & P. Maliga, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **91** (1994) p.1969.
42) L. A. Allison, L. D. Simon, & P. Maliga, EMBO J. **15** (1996) p.2802.
43) G. Serino, & P. Maliga, Plant Physiol. **117** (1998) p. 1165.
44) M. A. Ayliffe, N. S. Scott, & J. N. Timmis, Mol. Biol. Evol. **15** (1998) p.738.
45) S. Ruf, H. Kössel, & R. Bock, J. Cell Biol. **139** (1997) p. 95.
46) A. Hansson, K. Amann, A. Zygadlo, J. Meurer, H. V. Scheller, & P. E. Jensen, FEBS J. **274** (2007) p.1734.
47) M. A. Schöttler, C. Flügel, W. Thiele, S. Stegemann, & R. Bock, Biochem. J. **403** (2007) p.251.
48) S. M. J. Klaus, F.-C. Huang, C. Eibl, H.-U. Koop, & T. J. Golds, Plant J. **35** (2003) p.811.
49) E. Baena-González, Y. Allahverdiyeva, Z. Svab, P. Maliga, E.-M. Josse, P. Mäenpää, & E.-M. Aro, Plant J. **35** (2003) p.704.
50) M. Swiatek, R. E. Regel, J. Meurer, G. Wanner, H. B. Pakrasi, I. Ohad, & R. G. Herrmann, Mol. Genet. Genomics **268** (2003) p.699.
51) M. Suorsa, R. E. Regel, V. Paakkarinen, N. Battchikova, R. G. Herrmann, & E.-M. Aro, Eur. J. Biochem. **271** (2004) p.96.
52) S. Schwenkert, P. Umate, C. Dal Bosco, S. Volz, L. Mlcochova, M. Zoryan, L. A. Eichacker, I. Ohad, R. G. Herrmann, & J. Meurer, J. Biol. Chem. **281** (2006) p. 34227.
53) M. Hager, M. Hermann, K. Biehler, A. Krieger-Liszkay, & R. Bock, J. Biol. Chem. **277** (2002) p.14031.
54) P. Umate, S. Schwenkert, I. Karbat, C. Dal Bosco, L. Mlčochová, S. Volz, H. Zer, R. G. Herrmann, I. Ohad, & J. Meurer, J. Biol. Chem. **282** (2007) p.9758.
55) P. Umate, C. Fellerer, S. Schwenkert, M. Zoryan, L. A. Eichacker, A. Sadanandam, I. Ohad, R. G. Herrmann, & J. Meurer, Plant Physiol. **148** (2008) p.1342.
56) P. Mäenpää, E. B. Gonzalez, M. S. Khan, J. C. Gray, & E.-M. Aro, J. Exp. Bot. **51** (2000) p.375.
57) S. Ruf, K. Biehler, & R. Bock, J. Cell Biol. **149** (2000) p.369.
58) E. Baena-González, J. C. Gray, E. Tyystjärvi, E.-M. Aro, & P. Mäenpää, J. Biol. Chem. **276** (2001) p.20795.
59) M. Swiatek, R. Kuras, A. Sokolenko, D. Higgs, J. Olive, G. Cinque, B. Müller, L. A. Eichacker, D. B. Stern, R. Bassi, R. G. Herrmann, & F.-A. Wollman, Plant Cell **13** (2001) p.1347.
60) R.-A. Monde, F. Zito, J. Olive, F.-A. Wollman, & D. B. Stern, Plant J. **21** (2000) p.61.
61) S. Schwenkert, J. Legen, T. Takami, T. Shikanai, R.

G. Herrmann, & J. Meurer, Plant Physiol. **144** (2007) p. 1924.
62) A. Fiebig, S. Stegemann, & R. Bock, Nucleic Acids Res. **32** (2004) p.3615.
63) M. A. Schöttler, C. Flugel, W. Thiele, & R. Bock, J. Biol. Chem. **282** (2007) p.976.
64) M. Hager, K. Biehler, J. Illerhaus, S. Ruf, & R. Bock, EMBO J. **18** (1999) p.5834.
65) W. Kofer, H.-U. Koop, G. Wanner, & K. Steinmüller, Mol. Gen. Genet. **258** (1998) p.166.
66) T. Shikanai, T. Endo, T. Hashimoto, Y. Yamada, K. Asada, & A. Yokota, *Proc*. Natl. Acad. Sci. USA **95** (1998) p.9705.
67) E. M. Horváth, S. O. Peter, T. Joët, D. Rumeau, L. Cournac, G. V. Horvath, T. A. Kavanagh, C. Schäfer, G. Peltier, & P. Medgyesy, Plant Physiol. **123** (2000) p. 1337.
68) P. A. Burrows, L. A. Sazanov, Z. Svab, P. Maliga, & P. J. Nixon, EMBO J. **17** (1998) p.868.
69) A. Takabayashi, T. Endo, T. Shikanai, & F. Sato, Biosci. Biotechnol. Biochem. **66** (2002) p.2107.
70) M. Martín, L. M. Casano, J. M. Zapata, A. Guéra, E. M. del Campo, C. Schmitz-Linneweber, R. M. Maier, & B. Sabater, Physiol. Plant. **122** (2004) p.443.
71) D. Karcher, & R. Bock, J. Biol. Chem. **277** (2002) p. 5570.
72) V. Kode, E. A. Mudd, S. Iamtham, & A. Day, Plant J. **46** (2006) p.901.
73) T. Shikanai, K. Shimizu, K. Ueda, Y. Nishimura, T. Kuroiwa, & T. Hashimoto, Plant Cell Physiol. **42** (2001) p.264.
74) H. Kuroda, & P. Maliga, Nature **425** (2003) p.86.
75) V. Kode, E. A. Mudd, S. Iamtham, & A. Day, Plant J. **44** (2005) p.237.
76) G. De Santis-Mociossek, W. Kofer, A. Bock, S. Schoch, R. M. Maiewr, G. Wanner, W. Rüdiger, H. U. Koop, & R. G. Herrrmann, Plant J. **18** (1999) p.477.
77) M. Rogalski, M. A. Schottler, W. Thiele, W. X. Schulze, & R. Bock, Plant Cell **20** (2008) p.2221.
78) D. Ahlert, S. Ruf, & R. Bock, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **100** (2003) p.15730.
79) M. Rogalski, S. Ruf, & R. Bock, Nucleic Acids Res. **34** (2006) p.4537.
80) J. Legen, G. Wanner, R. G. Herrmann, I. Small, & C. Schmitz-Linneweber, Plant J. **51** (2007) p.751.
81) M. Rogalski, D. Karcher, & R. Bock, Nat. Struct. Mol. Biol. **15** (2008) p.192.
82) S. Corneille, K. Lutz, Z. Svab, & P. Maliga, Plant J. **27** (2001) p.171.
83) P. T. J. Hajdukiewicz, L. Gilbertson, & J. M. Staub, Plant J. **27** (2001) p.161.
84) H.-U. Koop, K. Steinmüller, H. Wagner, C. Rössler, C. Eibl, & L. Sacher, Planta **199** (1996) p.193.
85) M. Sugita, Z. Svab, P. Maliga, & M. Sugiura, Mol. Gen. Genet. **257** (1997) p.23.
86) A. Drescher, S. Ruf, T. Calsa, H. Carrer, & R. Bock, Plant J. **22** (2000) p.97.
87) K. Tsuruya, M. Suzuki, W. Plader, C. Sugita, & M. Sugita, Acta Physiol. Plant. **28** (2006) p.365.
88) M. Swiatek, S. Greiner, S. Kemp, A. Drescher, H.-U. Koop, R. G. Herrmann, & R. M. Maier, Curr. Genet. **43** (2003) p.45.
89) S. K. Mühlbauer, A. Lössl, L. Tzekova, Z. Zou, & H.-U. Koop, Plant J. **32** (2002) p.175.
90) T. Shikanai, Annu. Rev. Plant Biol. **58** (2007) p.199.
91) T. Endo, S. Ishida, N. Ishikawa, & F. Sato, Mol. Cells **25** (2008) p.158.
92) S. Baginsky, A. Siddique, & W. Gruissem, J. Proteome Res. **3** (2004) p.1128.
93) W. Majeran, F. A. Wollman, & O. Vallon, Plant Cell **12** (2000) p.137.
94) J. M. Staub, & P. Maliga, Plant Cell **4** (1992) p.39.
95) R. Bock, H. Kössel, & P. Maliga, EMBO J. **13** (1994) p.4623.
96) S. M. Whitney, S. von Caemmerer, G. S. Hudson, & T. J. Andrews, Plant Physiol. **121** (1999) p.579.
97) I. Kanevski, P. Maliga, D. F. Rhoades, & S. Gutteridge, Plant Physiol. **119** (1999) p.133.
98) S. M. Whitney, & T. J. Andrews, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **98** (2001) p.14738.
99) R. E. Sharwood, S. von Caemmerer, P. Maliga, & S. M. Whitney, Plant Physiol. **146** (2008) p.83.
100) J. Y. Suzuki, & P. Maliga, Curr. Genet. **38** (2000) p. 218.
101) J. Y. Suzuki, A. J. Ytterberg, T. A. Beardslee, L. A. Allison, K. J. van Wijk, & P. Maliga, Plant J. **40** (2004) p.164.
102) H. Fey, D. Piano, R. Horn, D. Fischer, M. Schmidt, S. Ruf, W. P. Schroder, R. Bock, & C. Buchel, Biochim. Biophys. Acta **1777** (2008) p.1501.
103) R. Bock, RNA Interference, editing, and Modification, ed. J. M. Gott, Totowa, Humana Press, 2004, p.345.
104) M. Knoblauch, J. M. Hibberd, J. C. Gray, & A. J. E. Van Bel, Nat. Biotechnol. **17** (1999) p.906.
105) O. V. Zoubenko, L. A. Allison, Z. Svab, & P. Maliga, Nucleic Acids Res. **22** (1994) p.3819.
106) T. Adachi, H. Takase, & K. Tomizawa, Biosci. Biotechnol. Biochem. **71** (2007) p.2266.
107) K. A. Lutz, M. H. Bosacchi, & P. Maliga, Plant J. **45** (2006) p.447.
108) T. A. Kavanagh, N. D. Thanh, N. T. Lao, N. McGrath, S. O. Peter, E. M. Horváth, P. J. Dix, & P. Medgyesy, Genetics **152** (1999) p.1111.
109) D. Rumeau, N. Becuwe-Linka, A. Beyly, P. Carrier, S.

Cuine, B. Genty, P. Medgyesy, E. Horvath, & G. Peltier, Plant Biotechnol. J. **2** (2004) p.389.
110) K. Terpe, *Appl. Microbiol*. Biotechnol. **60** (2003) p.523.
111) H. Carrer, T. N. Hockenberry, Z. Svab, & P. Maliga, Mol. Gen. Genet. **241** (1993) p.49.
112) F.-C. Huang, S. M. Klaus, S. Herz, Z. Zou, H.-U. Koop, & T. J. Golds, Mol. Genet. Genomics **268** (2002) p. 19.
113) H. Daniell, B. Muthukumar, & S. B. Lee, *Curr. Genet*. **39** (2001) p.109.
114) H. Carrer, & P. Maliga, Biotechnology **13** (1995) p. 791.
115) M. S. Khan, & P. Maliga, Nat. Biotechnol. **17** (1999) p. 910.
116) K. A. Lutz, S. Corneille, A. Azhagiri, Z. Svab, & P. Maliga, Plant J. **37** (2004) p.906.
117) H. Daniell, R. Datta, S. Varma, S. Gray, & S. B. Lee, Nat. Biotechnol. **16** (1998) p.345.
118) K. A. Lutz, J. E. Knapp, & P. Maliga, Plant Physiol. **125** (2001) p.1585.
119) M. Shimizu, M. Goto, M. Hanai, T. Shimizu, N. Izawa, H. Kanamoto, K. Tomizawa, A. Yokota, & H. Kobayashi, Plant Physiol. **147** (2008) p.1976.
120) H. Kuroda, & P. Maliga, Plant Physiol. **129** (2002) p. 1600.
121) P. Maliga, & P. J. Nixon, Trends Plant Sci. **3** (1998) p. 376.
122) G.-N. Ye, S.-Z. Pang, & J. C. Sanford, Plant Cell Rep. **15** (1996) p.479.
123) J. S. Tregoning, P. Nixon, H. Kuroda, Z. Svab, S. Clare, F. Bowe, N. Fairweather, J. Ytterberg, K. J. van Wijk, G. Dougan, & P. Maliga, Nucleic Acids Res. **31** (2003) p.1174.
124) C. A. Conley, & M. R. Hanson, J. Bioenerg. Biomembr. **27** (1995) p.447.
125) Z. Chen, K. F. Schertz, J. E. Mullet, A. DuBell, & G. E. Hart, Plant Mol. Biol. **28** (1995) p.799.
126) C. Marker, A. Zemann, T. Terhörst, M. Kiefmann, J. P. Kastenmayer, P. Green, J.-P. Bachellerie, J. Brosius, & A. Hüttenhofer, Curr. Biol. **12** (2002) p.2002.
127) B. Lung, A. Zemann, M. J. Madej, M. Schuelke, S. Techritz, S. Ruf, R. Bock, & A. Huttenhofer, Nucleic Acids Res. **34** (2006) p.3842.

# 7．アグロバクテリウム法によるイネの形質転換

増本　千都[1)]，宮尾　光恵[2)]

イネはアグロバクテリウムの宿主でないため，イネへの遺伝子導入はエレクトロポレーションやパーティクルガン等の直接導入法が主流であった．近年アグロバクテリウムを介した間接導入法が適用され，未経験者でも容易にイネに遺伝子を導入できるようになった．

## *Agrobacterium*-mediated transformation of rice

Chisato Masumoto, Mitsue Miyao

Application of *Agrobacterium*-mediated gene transfer to rice transformation enabled us to produce transgenic rice plants efficiently and easily.

### 7.1　原理と概要

従来イネへの遺伝子導入は，プロトプラストを用いたエレクトロポレーション法やPEG（ポリエチレングリコール）法，カルスを用いたパーティクルガン法等，直接導入法が中心であった．1994年にアグロバクテリウム（*Rhizobium　radiobacter*；旧称 *Agrobacterium tumefaciens*）を介したイネへの遺伝子導入法が開発された[1)]．本法では特殊な装置が不要で操作も簡単であり，かつ高効率で完全長の遺伝子をゲノムに導入できる．遺伝子導入法と培地組成[2-6)]，また遺伝子導入用バイナリーベクターと選抜薬剤耐性マーカー遺伝子にも改良が重ねられ，現在では未経験者でも簡単に形質転換イネが作製できるようになった．

単子葉植物であるイネはアグロバクテリウムの宿主範囲外である．アグロバクテリウムの宿主となる双子葉植物では，アグロバクテリウムが感染するとTiプラスミドの *Vir* 領域を活性化するフェノール化合物（アセトシリンゴン，シナピン酸等）が合成され，Tiプラスミドからの T-DNA が切り出され，いくつかの過程を経て宿主の核染色体DNAに組み込まれる．イネはこれらのフェノール化合物を合成しないためアグロバクテリウム法が適用できなかったが，アグロバクテリウム感染時にアセトシリンゴンを添加することによって，アグロバクテリウムを介した遺伝子導入が可能になった[1)]．現在用いられている一般的な方法は，再分化能が高い種子胚盤由来のカルスにアグロバクテリウムを感染させる方法（カルス法）で，遺伝子が導入されたカルスを薬剤（抗生物質）耐性で選抜したのち，植物体を再分化させる．感染から約3ヶ月で形質転換イネが得られる．種子に直接アグロバクテリウムを感染させカルス培養期間を短縮する方法（種子法）も報告されている[6)]．

イネへの遺伝子導入効率が高いことから，アグロバクテリウムの系統EHA101とEHA105がもっともよく使われている．EHA105は，カナマイシン耐性（$Km^r$）のEHA101からカナマイシン耐性遺伝子を除いた系統で，バイナリーベクター（$Km^r$）が導入されたアグロバクテリウムをカナマイシン耐性で確実に選抜することができる．選抜用薬剤としては，ハイグロマイシン（hygromycin，Hm；原核型タンパク質合成阻害剤）が汎用されている．しかし，ハイグロマイシンの場合は耐性カルスの選抜が難しいことから，ビアラフォス（bialaphos；グルタミン合成酵素阻害剤），ALS（アセト乳酸脱水素酵素）阻害剤等，除草剤を選抜薬剤として用いる方法が複数開発されている．バイナリーベクターは，pBI101由来のベクターに薬剤耐性遺伝子（ハイグロマイシン耐性遺伝子，*hpt*；ビアラフォス耐性遺伝子，*bar* 等）を導入したもの（例えば，pBI101Hm，pIG121Hm，pGPTVbar）が汎用されている．また，市販のpCAMBIAシリーズも使用できる（pBI101系ベクターに比べて大腸菌内での増幅コピー数が多い）．

以下にカルス法による遺伝子導入の概要を示す．

1．種子からのカルス誘導（3週間）
　種子をオーキシン（2,4-D）を含む培地で培養し，胚盤からカルスを誘導．

2．カルスの前培養（2,4-Dを含む培地；3日間）
　アグロバクテリウム感染に先立ち，カルスの増殖能

1）農業生物資源研究所　光環境応答研究ユニット
2）農業生物資源研究所　光環境応答研究ユニット

を高める．

3．アグロバクテリウムの前培養（3 日間）

グリセロールストックからアグロバクテリウムを増殖．

4．カルスのアグロバクテリウム感染（3 日間）

カルスにアグロバクテリウムを接種し，アセトシリンゴン存在下で共存培養し感染させる．

5．アグロバクテリウムの除去と薬剤選抜（2 週間×１または×２）

カルスをカルベニシリン（carbenicillin；グラム陰性桿菌用抗生物質，アグロバクテリウム除菌用）溶液で洗浄し，アグロバクテリウムを除去．引き続き，カルベニシリンと選抜薬剤を含むカルス増殖培地（2,4-D を含む）でカルスを選抜．

6．植物体の再分化（1-2 週間）

オーキシン（ナフタレン酢酸；NAA），サイトカイニン（カイネチン），選抜薬剤，カルベニシリンを含む培地で培養し，遺伝子が導入されたカルスから植物体を再分化．

7．根の伸長促進と再分化植物の育成（2-3 週間）

ホルモン（オーキシン，サイトカイニン）を含まない培地（選抜薬剤を含む）で根を伸長させ，植物体を大きくする．

8．再分化植物の土壌への移植

## 7.2　イネへの遺伝子導入法

アグロバクテリウム EHA 株，pBI 系あるいは pCAMBIA 系バイナリーベクター，選抜薬剤としてハイグロマイシンとビアラフォスを用いたカルス法（文献[3,4]を若干改変）を紹介する．種子法に比べて時間がかかるものの，少ない種子から多数の形質転換イネが得られる．一般的な日本型イネ品種（日本晴，キタアケ，農林 6 号，農林 8 号：日本晴型）に用いられる培地組成と作製法を表 1-3 に示す．日本晴はカルス培養が容易な品種であり，50％以上の種子から増殖能の高いカルスが得られ，遺伝子導入効率（最終的に得られる形質転換イネの個体数）はアグロバクテリウムを感染させたカルス数の 50％に達する．キタアケの場合は，日本晴に比べるとカルスの増殖が若干悪く，遺伝子導入効率は 10-20％である．

コシヒカリ，あきたこまち，ひとめぼれはカルス培養が困難な品種として知られている．これはカルスの亜硝酸還元酵素活性が低いことが原因で，一般的な培養条件では亜硝酸が蓄積し，カルスが褐変，壊死するためである[7]．これらの品種でも培地組成を改良することで遺伝子導入が可能になっている[7]．

アグロバクテリウムは 28℃，暗所で培養する．カルスと植物体は 28-33℃，明所（30 $\mu$mol photons $m^{-2}s^{-1}$）で培養する．シャーレはガンマ線滅菌されたプラスチックシャーレ（直径 9 cm，深さ 20 mm（アグロバクテリウム用のみ深さ 15 mm））を用い，培地を入れたプレートはサージカルテープでシールする．2-3 日間室温で保存し，

**表 1**：抗生物質・ホルモンストック溶液の調製

| 試薬名・調製法 | 濃度 |
|---|---|
| Carbenicillin | 200 mg/ml |
| Hygromycin B | 50 mg/ml |
| Bialaphos（明治製菓） | 25 mg/ml |
| Kanamycin | 25 mg/ml |
| すべて Milli Q 水（DW）に溶解し，フィルター滅菌（0.22 $\mu$m）．1 ml ずつ分注（Bialaphos は 200 $\mu$l ずつ）．−20℃保存． | |
| 2,4-D（2, 4-dichlorophenoxyacetic acid）（Sigma） | 0.2 mg/ml |
| 0.04 g を 10 ml エタノール（99.5％）に溶解し，DW で 200 ml にメスアップ． 4 ℃保存． | |
| Acetosyringone（Aldorich） | 100 mg/ml |
| DMSO で溶解．フィルター滅菌できないため，できるだけ無菌状態で調製．50 $\mu$l ずつ分注， 4 ℃遮光保存または−20℃保存． | |
| Kinetin | 200 $\mu$g/ml |
| 20 mg を 5 ml の 1 N NaOH に溶解し，DW で 100 ml にメスアップ． 4 ℃保存． | |
| NAA（$\alpha$-naphthaleneacetic acid） | 200 $\mu$g/ml |
| 10 mg を 1 ml の 1 N　NaOH に溶解．溶液 100 $\mu$l を DW で 5 ml にメスアップ． 4 ℃保存． | |

**表 2**：植物用培地の調製

カルス誘導，共存培養，薬剤選抜用培地

N6D 培地（カルス誘導用，薬剤選抜用）

| 最終濃度 | 試薬名・ストック溶液名 | 1 l |
|---|---|---|
| ① 3% | Sucrose | 30 g |
| ② 300 mg/l[a] | Casamino acids | 300 mg |
| ③ 25 mM | Proline | 2.9 g |
| ④ | Chu N6 basal salt mixture (Sigma) | 1 袋 |
| ⑤ | N6 Vitamin（×1000）[b] | 1 ml |
| ⑥ 2 mg/l | 2, 4-D（×100，0.2 mg/ml） | 10 ml |
| ↓ 2 N KOH で pH 5.8 に調整し，1 l にメスアップ． | | |
| ⑦ 0.4% | Gelrite | 4 g |
| ↓ オートクレーブ | | |
| 選抜培地作製時は，約 60°C に冷ましたのち抗生物質を添加． | | |
| 300 mg/l | Carbenicillin（200 mg/ml） | 1.5 ml |
| 50 mg/l | Hygromycin（50 mg/ml） | 1 ml |
| または | | |
| 5 mg/l | Bialaphos（25 mg/ml） | 200 μl |

50 ml ずつ深型シャーレ（90×20 mm）に分注．

[a] ビアラフォス選抜の場合，カザミノ酸濃度は 200 mg/l．

[b] N6 Vitamin ストック溶液（×1000）25 ml，Glycine 50 mg；Nicotinic acid 12.5 mg；Pyridoxine-HCl 12.5 mg；Thiamine-HCl 25 mg；myo-Inositol 2.5 g．−20°C保存．

2N6-AS 培地（共存培養用）

| 最終濃度 | 試薬名・ストック溶液名 | 1 l |
|---|---|---|
| ① 3% | Sucrose | 30 g |
| ② 300 mg/l | Casamino acids | 300 mg |
| ③ | Chu N6 basal salt mixture (SIGMA) | 1 袋 |
| ④ | N6 Vitamin（×1000） | 1 ml |
| ⑤ 2 mg/l | 2, 4-D（×100，0.2 mg/ml） | 10 ml |
| ↓ 2 N KOH で pH 5.2 に調整し，0.9 l にメスアップ． | | |
| ⑥ 0.4% | Gelrite | 4 g |
| ↓ オートクレーブ | | |
| 約 60°C に冷ましたのち以下を添加． | | |
| ⑦ 1% | 10%（w/v）D-(+)-Glucose[c]（オートクレーブ滅菌） | 100 ml |
| ⑧ 10 mg/l | Acetosyringone（100 mg/ml） | 100 μl |

50 ml ずつ深型シャーレ（90×20 mm）に分注．

[c] 10%（w/v）D-(+)-Glucose 溶液：グルコースは溶けにくいので，攪拌しながら粉末を添加し，溶解する．

再分化培地，発根用ホルモンフリー培地

再分化培地

| 最終濃度 | 試薬名・ストック溶液名 | 1 l |
|---|---|---|
| ① 3% | Sucrose | 30 g |
| ② 3% | Sorbitol | 30 g |
| ③ 2 g/l | Casamino acids | 2 g |
| ④ | MS Powder（Wako） | 1 袋 |
| ⑤ | MS Vitamin（×1000）[d] | 1 ml |
| ⑥ 2 μg/l | NAA（×10000，200 μg/ml） | 10 μl |
| ⑦ 2 mg/l | Kinetin（×100，200 μg/ml） | 10 ml |
| ↓ 1 N HCl で pH 5.8 に調整し，1 l にメスアップ． | | |
| ⑧ 0.4% | Gelrite | 4 g |
| ↓ オートクレーブ | | |
| 約 60°C に冷ましたのち抗生物質を添加． | | |
| 100 mg/l | Carbenicillin（200 mg/ml） | 0.5 ml |
| 50 mg/l | Hygromycin（50 mg/ml） | 1 ml |
| または | | |
| 5 mg/l | Bialaphos（25 mg/ml） | 200 μl |

50 ml ずつ深型シャーレ（90×20 mm）に分注．

[d] MS Vitamin ストック溶液（×1000）25 ml，Glycine 50 mg；Nicotinic acid 12.5 mg；Pyridoxine-HCl 12.5 mg；Thiamine-HCl 2.5 mg；*myo*-Inositol 2.5 g．−20°C保存．

発根用ホルモンフリー培地

| 最終濃度 | 試薬名・ストック溶液名 | 1 l |
|---|---|---|
| ① 3 % | Sucrose | 30 g |
| ② | MS powder（Wako） | 1 袋 |
| ③ | MS Vitamin（×1000） | 1 ml |
| ↓ 2 N KOH で pH 5.8 に調整し，1 l にメスアップ． | | |
| ↓ オートクレーブ | | |
| 約 60°C に冷ましたのち抗生物質を添加． | | |
| 50 mg/l | Hygromycin（50 mg/ml） | 1 ml |
| または | | |
| 5 mg/l | Bialaphos（25 mg/ml） | 200 μl |
| 50 ml ずつ深型シャーレ（90×20 mm）に分注． | | |

カビ等が生えていないこと確認してから 4 °Cで保存．3 ヶ月以上は保存しない．選抜に用いるハイグロマイシン，ビアラフォス濃度はそれぞれ 50，5 mg/l である（日本晴，キタアケの場合）．

### 7.2.1 種子の選別，種子滅菌とカルス誘導

玄米を 2,4-D を含むカルス誘導用プレート（N6D 培地）で培養し，胚盤からカルスを誘導・増殖させる．

[準備]

種子（籾）約 150 粒；小型籾すり器（藤原製作所）；プラスチックシャーレ；70%エタノール；次亜塩素酸ナトリウム溶液（食品添加物用，有効塩素濃度約 5 %）；Tween 20；50 ml ファルコンチューブ；滅菌水約 1 l；レシプロ型振盪機；オートクレーブ滅菌した濾紙（直径 7 cm，数〜10 枚）；オートクレーブ滅菌したピンセット；N6D プレート 10 枚．サージカルテープ．

[実験方法]

1．よく充実した種子（籾）を選ぶ．黒ずんだり傷のある籾は使わない．小型籾摺り器で籾殻を取り除く．白色半透明の玄米 100-150 粒を選抜する．緑色あるいは黒ずんだ玄米はカビ等の混入の原因となるので除く．

**表 3**：アグロバクテリウム用培地の調製

AB 培地（アグロバクテリウム培養用）

| 最終濃度 | 試薬名・ストック溶液名 | 1 l |
|---|---|---|
| ① 3 g/l | $K_2HPO_4$ | 3 g |
| ② 1.3 g/l | $NaH_2PO_4$・2 $H_2O$ | 1.3 g |
| ③ 1 g/l | $NH_4Cl$ | 1 g |
| ④ 0.15 g/l | KCl | 0.15 g |
| ⑤ 10 mg/l | $CaCl_2$・2 $H_2O$ | 10 mg |
| ⑥ 2.5 mg/l | 25 mg/ml $FeSO_4$・7 $H_2O$（用時調製） | 100 μl |
| ↓ 2 N KOH で pH 7.2 に調整し，0.9 l にメスアップ． | | |
| ↓ 300 ml の三角フラスコに 180 ml ずつ分注． | | |
| ⑦ 1.5% | Bacto agar | 3 g/180 ml |
| ↓ オートクレーブ | | |
| 約 60℃に冷ましたのち以下を添加． | | |
| ⑧ 0.5% | 5%(w/v)D-(+)-Glucose（オートクレーブ滅菌） | 20 ml |
| ⑨ 1.2 mM | 1 M $MgSO_4$・7 $H_2O$（オートクレーブ滅菌） | 240 μl |
| ⑩ 50 mg/l | Kanamycin(25 mg/ml) | 400 μl |
| ハイグロマイシン選抜の場合 | | |
| 50 mg/l | Hygromycin(50 mg/ml) | 200 μl |
| ビアラフォス選抜の場合，選抜薬剤は添加しない． | | |

約 20 ml ずつ薄型シャーレ（90×15 mm）に分注．

AAM 培地（アグロバクテリウム感染用）

ストック溶液の組成

| | |
|---|---|
| 1．AA-1 ストック溶液（×1000） | 100 ml |
| 次の順に溶解させる．KI 75 mg；$CoCl_2$・6 $H_2O$ 2.5 mg；<br>$CuSO_4$・5 $H_2O$ 2.5 mg；$Na_2MoO_4$・2 $H_2O$ 25 mg；$ZnSO_4$<br>・4 $H_2O$ 0.2 g；$MnSO_4$・6 $H_2O$ 1 g． | |
| 2．AA-2 ストック溶液（×1000） | 100 ml |
| $CaCl_2$・2 $H_2O$ 15 g | |
| 3．AA-3 ストック溶液（×1000） | 100 ml |
| $MgSO_4$・7 $H_2O$ 25 g | |
| 4．Fe-EDTA ストック溶液（×1000） | 100 ml |
| Fe-EDTA 4 g | |
| 5．AA-5 ストック溶液（×1000） | 100 ml |
| $NaH_2PO_4$・2 $H_2O$ 15 g | |
| 6．AA-Sol ストック溶液（×100） | 100 ml |
| L-Arginine 1.77 g | |
| Glycine 75 mg | |
| 7．AA-KCl ストック溶液（×50） | 100 ml |
| KCl 15 g | |
| 8．AA-6 Vitamin ストック溶液(×1000) | 10 ml |
| Nicotinic acid 10 mg；Pyridoxine-HCl 10 mg；<br>Thiamine-HCl 0.1 g；*myo*-Inositol 1 g． | |

AA-6 Vitamin は−20℃保存．それ以外は 4 ℃保存．

AAM 培地

| 最終濃度 | 試薬名・ストック溶液名 | 1 l |
|---|---|---|
| ① 0.3 g/l | L-Aspartic acid[a] | 0.3 g |
| ② | AA-1(×1000) | 1 ml |
| ③ | AA-2(×1000) | 1 ml |
| ④ | AA-3(×1000) | 1 ml |
| ⑤ | Fe-EDTA(×1000) | 1 ml |
| ⑥ | AA-5(×1000) | 1 ml |
| ⑦ | AA-6 Vitamin(×1000) | 1 ml |
| ⑧ | AA-Sol(×100) | 10 ml |
| ⑨ | AA-KCl(×50) | 20 ml |
| ⑩ 0.5 g/l | Casamino acids | 0.5 g |
| ⑪ 6.85% | Sucrose | 68.5 g |
| ⑫ 0.9 g/l | L-Glutamine | 0.9 g |
| ↓ 2 N KOH で pH 5.2 に調整し，0.9 L にメスアップ． | | |
| ↓オートクレーブ | | |
| 室温に冷ましたのちグルコース溶液を添加． | | |
| ⑬ 3.6% | 36%(w/v)D-(+)-Glucose（オートクレーブ滅菌） | 100 ml |

100 ml 三角フラスコに 90 ml ずつ分注し，4 ℃保存．

[a] L-Aspartic acid は溶解しにくいので最初に加える．

2．滅菌溶液を作製する．50 ml ファルコンチューブに次亜塩素酸ナトリウム溶液 20 ml，滅菌水 20 ml，Tween 20 を 1 滴入れる．チューブ 2 本を用時調製．

3．選抜した玄米 100–150 粒をシャーレに入れる．玄米が浸かる程度に 70%エタノールを加え，30 秒間手で軽く振盪したのち，70%エタノールを素早く捨てる．この操作で滅菌溶液を浸透しやすくする．

4．玄米を滅菌溶液に移し，150–200 rpm で 15 分間振盪する．

5．デカントで滅菌溶液を交換し，15 分間振盪する．以下はクリーンベンチ内で作業する．

6．チューブをデカントして滅菌溶液を捨て，新たに滅菌水 40 ml を入れ玄米をすすぐ．この操作を 5–6 回繰り返し，最後に洗浄水を捨てる．

7．プラスチックシャーレに滅菌濾紙を数枚入れ，その上に滅菌した玄米を広げ水を切る．

8．ピンセットで玄米を N6D プレートに置床する（プレート 1 枚あたり 10 粒；プレート 10 枚）．この時，胚だけ培地から出るようにする．シャーレをサージカルテープでシールする．

9．30–33℃で 21 日間培養する（暗所，明所どちらでも構わない）．

- 培養開始後数日間は，カビや雑菌が発生していないか毎日チェックする（雑菌等が生えると種子のまわりが白濁する．プレートを光にかざすとわかりやすい）．雑菌等が生えた種子は取り除く．種子を除いても雑菌は残されたままなので，雑菌発生場所近傍の種子から増殖したカルスは使用しない．
- 誘導されたカルスを培地に直接置き直すと，増殖が促進される．

●カルスの増殖が悪い場合（多くは褐色を呈する）は，培地のカザミノ酸（窒素源）濃度を上げると改善されることが多い．

### 7.2.2　カルスの前培養（感染 3 日前に開始）

増殖能の高いカルス選抜し，新しい N6D プレートに移植する．アグロバクテリウムを感染させるカルスの増殖能が遺伝子導入効率に大きく影響する．胚盤上で増殖したカルスの塊より，塊からこぼれ落ちたカルスの方が増殖能が高い．褐色がかったカルスは増殖能が低いので使用しない．カルスの増殖に問題がなければ，玄米 1 個から感染に使用できるカルスが 5-20 個取れる．

[準備]

N6D プレート 2 枚；ピンセット（滅菌済み）；サージカルテープ．

[実験方法]

1．直径約 2-3 mm の淡黄色で固いカルスを選び，ピンセットで新しい N6D プレートに置床する（プレート 1 枚あたり 200 個，プレート 2 枚）．この時カルスをプレートに軽く押しつけるようにする．
2．30-33℃，3 日間培養する（暗所，明所どちらでも構わない）．

### 7.2.3　アグロバクテリウムの前培養（感染 3 日前に開始）

バイナリーベクターを導入したアグロバクテリウムを増殖させる．ハイグロマイシン選抜の場合，カナマイシンとハイグロマイシンを含む培地（AB 培地）で培養する．ビアラフォス選抜の場合，カナマイシンのみを含む培地を使用する．

[準備]

AB プレート（カルス 400 個あたり 1 枚）；白金耳または滅菌済みミクロスパーテル；サージカルテープ．

[実験方法]

1．アグロバクテリウムのグリセロールストックの表面を白金耳またはミクロスパーテルで掻き取る．
2．AB プレートにアグロバクテリウムを塗布し，サージカルテープでシールする．
3．28℃，暗所で 3 日間培養する．30℃を越えるとアグロバクテリウムからプラスミドが脱落しやすくなるので培養温度に注意する．

### 7.2.4　アグロバクテリウムの接種と共存培養

カルスにアグロバクテリウムを接種したのち，3 日間共存培養して感染させる．接種時のアグロバクテリウム濃度が低い方が感染効率が高い．アグロバクテリウム懸濁液がかすかに濁るか濁らない程度で充分である．

[準備]

50 ml ファルコンチューブ；AAM 培地；アセトシリンゴン溶液；2N6AS プレート 1 枚；滅菌した濾紙（直径 7 cm）；ミクロスパーテル（滅菌済み）；駒込ピペット（10 ml，滅菌済み）；ステンレス製茶こし（滅菌済み）；ピンセット（滅菌済み）；プラスチックシャーレ．

[実験方法]

1．50 ml ファルコンチューブに AAM 培地 40 ml を入れ，アセトシリンゴン溶液（100 mg/ml）を 4 μl 加える（終濃度 10 mg/l）．
2．2N6AS プレート上に滅菌した濾紙をのせ，その上にステップ 1 のアセトシリンゴン入り AAM 培地を 1 ml 注ぐ．
3．茶こしを空のプラスチックシャーレに置く．シャーレの蓋に滅菌濾紙を 2-3 枚敷く．
4．前培養したアグロバクテリウムをミクロスパーテルで掻き取り（ミクロスパーテルの 1/5 程度，約 5 μl；図 1），ステップ 1 の AAM 培地（約 40 ml）に懸濁する．懸濁液を駒込めピペットで 100 回程度ピペッティングしてアグロバクテリウムを分散させる．

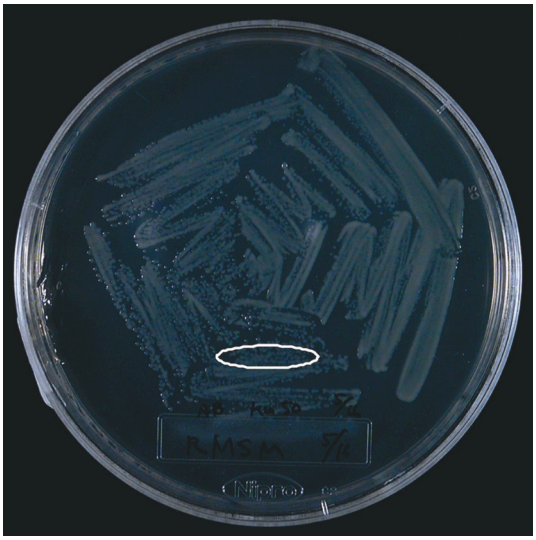


**図 1**：AB 培地で 3 日間培養したアグロバクテリウム．
コロニーが判別できる程度に増殖したところ（丸で囲んだ部分）の菌体をミクロスパーテルで掻き取り，アグロバクテリウム感染用の AAM 培地 40 ml に懸濁する．

5．プラスチックシャーレに置いた茶こし(ステップ3)に前培養したカルスを約200個入れる(100-200個)．この時，直径約2 mmの淡黄色の固いカルスを選ぶ．
6．カルスにアグロバクテリウム懸濁液(約40 ml)をかけ,茶こしを時々揺すりながら90-120秒間アグロバクテリウムを接種する．
7．シャーレの蓋に敷いたろ紙（ステップ3）の上に茶こしを置き，アグロバクテリウム懸濁液を切る．
8．2N6ASプレート上に敷いた濾紙(ステップ2)にカルスを置床し(プレート1枚あたり約200個)，サージカルテープでシールする．
9．28℃，暗所で3日間培養する．3日間培養するとアグロバクテリウムがカルスを覆うように増殖する．

### 7.2.5 アグロバクテリウムの除去（除菌）とカルスの薬剤選抜

アグロバクテリウムと共存培養したカルスをカルベニシリン溶液（500 mg/l）で洗浄したのち，カルベニシリン(300 mg/l)と選抜薬剤を含むN6D培地で培養し，薬剤耐性カルスを選抜する．2週間の薬剤選抜を2回繰り返すのが一般的であるが，ハイグロマイシン選抜の場合は耐性カルスと感受性カルスの区別がつきにくいため，2週間選抜培地で培養したのち，再分化を開始する．選抜培地での培養は除菌効果が高いため,最低1回は行う．ビアラフォス選抜の場合は，2回（2週間×2）または3回（2週間×2，7-10日間×1）の培養で耐性カルスが選抜できる（感受性カルスは増殖せず，褐変する)．

[準備]

50 mlファルコンチューブ；滅菌水；カルベニシリンストック溶液；選抜用N6Dプレート（選抜1回あたり8枚)；ピンセット（滅菌済み)；サージカルテープ．

[実験方法]

1．滅菌水40 mlを入れた50 mlファルコンチューブに共存培養したカルス約200個（100-200個）を入れる．蓋をしてチューブを数回反転させ,カルスを洗浄する．この操作を5回繰り返す．
2．同様に,500 mg/lカルベニシリン溶液(滅菌水40 mlにカルベニシリンストック溶液を100 $\mu$l添加）でカルスを3回洗浄する．ここまでの操作でカルスは直径約3 mmに膨潤する．
3．選抜用N6Dプレートに直径約3 mmのカルスを置床する（プレート1枚あたり25個)．カルスの破片は置床しない．
4．30-33℃，14日間培養する(暗所，明所どちらでも構わない)．
●除菌が不充分でアグロバクテリウムが増殖する場合，カルスを滅菌水で5回，引き続きカルベニシリン溶液で5回洗浄し直すと除菌できる．ただし，この処理はアグロバクテリウムがコロニーを形成して1日以内でないと効果はない．
5．ビアラフォス選抜の場合は，選抜用N6Dプレート上で増殖したカルスの一部を次の選抜培地（カルベニシリン濃度を200 mg/lに下げた選抜用N6Dプレート）に移植し（プレート1枚あたり16個)，選抜を繰り返す．

### 7.2.6 植物体の再分化

NAA，カイネチン，選抜薬剤を含む再分化培地（MS培地＋ビタミン類，ショ糖，ソルビトール，カザミノ酸)でカルスを培養し，植物体を再分化させる．再分化培地にはカルベニシリン（200 mg/l）も含まれるが，アグロバクテリウムの増殖が認められる場合，カルスを新しいプレートに移植し直す．

[準備]

再分化用プレート；ピンセット（滅菌済み)．

[実験方法]

1．再分化用プレートにカルスを移植する．プレートを4区画に分け，1区画に同一カルス由来のカルス5-7個を置床する．
●薬剤選抜中に増殖するカルスは小さい塊を形成する．これらの小さいカルス，あるいは薬剤選抜用プレートに置床したカルスから形成した大きい塊の淡黄色の部分を置床する．
2．28-30℃，明所で7-14日間培養する（最長1ヶ月)．早いものでは培養3日目からカルスにグリーンのスポットが現れ，そこから植物体が再分化する．グリーンスポットをもつカルスが増えたら，1区画あたり5個程度残し，残りは除去する．
3．シュートが1-2 cmに伸長したら，発根用ホルモンフリー培地に移植する．再分化プレート上で根が伸長する場合もある．その場合，シュートと根を切らないように移植する．
4．再分化しなかった場合,カルスを100 mg/lカルベニシリンを含む再分化プレートに移植し（プレート1枚あたり5-10個)，28-30℃，明所で7-14日間培養する．

### 7.2.7　ホルモンフリー培地による根の伸長促進と土壌への移植

シュートが 1-2 cm に伸びた再分化植物をホルモンを含まない培地（ホルモンフリー培地；MS 培地＋ビタミン類，ショ糖）に移植し，根を伸長させる．再分化植物が充分に大きくなったら，空気（低湿度）に順化させたのち，土壌に移植する(鉢上げ)．ホルモンフリー培地で１ヶ月培養した個体も鉢上げする．

[準備]

発根用ホルモンフリープレート；ピンセット（滅菌済み)．

[実験方法]

1．シュートが 1-2 cm に伸びた再分化植物をホルモンフリープレートに移植する．通常単一のカルスから複数の植物体が再分化するので，まず再分化プレート上で植物を株分けする（シュートと根をもつ苗に分ける)．この時周囲のカルスをできるだけ除く．ホルモンフリープレートに小さな穴をあけ，株分けした苗を埋め込むように移植する．培養にともなってアルビノになるケースもあるので，同一カルス由来の苗をプレート 1 枚に 2-3 個体移植する．

2．28-30℃，明所で 2-3 週間培養する（最長 4 週間)．生育が悪い場合，新しいプレートに植え替える．

3．シャーレ一杯に植物体が成長したら（草丈 7 〜10 cm，根はプレートの底に展開する)，シャーレの蓋をはずし水を張って，明所（10 $\mu$mol photons $m^{-2}s^{-1}$ 以下；室内照明用蛍光灯程度の明るさ）に置き，植物体を 3 日間空気に順化させる．

4．流水あるいは水を張ったバットの中で培地を洗い落としながら再分化植物を株分けし，土壌に移植する．この時，シュート 1 個を 1 個体とする．移植後 5 日間程度は寒冷紗をかけ強光が当たらないようにする．

- 順化処理を行っても鉢上げ後枯死する場合があるので，同一カルス由来の再分化植物を 2-3 個体移植し，新しい葉が展開したら間引きする．
- 同一カルス由来であっても，株分けをせずに複数のシュートをまとめて移植するとキメラになる場合があるので，必ず株分けする．

## 参考文献


1）Y. Hiei, S. Ohta, T. Komari, & T. Kumashiro, Plant J. **6** (1994) P.271.

2）H. Rashid, S. Yokoi, K. Toriyama, & K. Hinata, Plant Cell Rep. **15** (1996) P.727.

3）S. Toki, Plant Mol. Biol. Rep. **15** (1997) P.16.

4）駒嶺穆，野村港二，「生物化学実験法 41　植物細胞工学入門」，学会出版センター，1998，P.311．

5）島本功，岡田清孝，「新版　モデル植物の実験プロトコール ── 遺伝的手法からゲノム解析まで」，秀潤社，2001，P.93．

6）S. Toki, N. Hara, K. Ono, H. Onodera, A. Tagiri, S. Oka, & H. Tanaka, Plant J. **47** (2006) P.969.

7）小川泰一，化学と生物 **38**（2000）P.189．

# 8．光合成細菌 *Rhodobacter capsulatus* における大量発現系と形質転換

藤田　祐一[1)]，野亦　次郎[2)]

光合成細菌 *Rhodobacter capsulatus* は，遺伝子操作系が確立されており，さまざまなタンパク質の大量発現系として有望な系である．本節では，*R. capsulatus* の発現ベクター系と形質転換系，特定の遺伝子破壊株の単離方法について紹介する．

## Transformation system of photosynthetic bacteria

Yuichi Fujita, Jiro Nomata

The purple nonsulfur bacterium *Rhodobacter capsulatus* provides a promising system for overexpression of various proteins as an alternative system of *E. coli*. Here we describe transformation system of *R. capsulatus* including overexpression vectors and targeted interposon mutagenesis.

### 8.1　光合成細菌 *Rhodobacter capsulatus* における大量発現系と形質転換

光合成細菌は，酸素を発生しない光合成を行う一群の光合成生物である[1)]．紅色非硫黄細菌 *Rhodobacter capsulatus* は，好気的環境では呼吸により，嫌気的環境では光合成により生育するなど，おかれた環境により多様な生育モードを採って生育できる多彩な能力を備えた光合成細菌である[2)]．このため，1970 年代から遺伝学的手法が開発され，光合成，呼吸，窒素固定，水素生成など多様な生物現象の生化学的，分子生物学的研究に用いられてきた．興味深いことに，光合成に関連した一群の遺伝子（集光性バクテリオクロロフィル結合タンパク質や反応中心タンパク質，バクテリオクロロフィルの生合成系，カロテノイドの生合成など光合成に関わる一揃いの酵素の遺伝子）がクロモゾーム上の 46 kb という限られた領域に密集し複数のオペロンを形成している．この光合成遺伝子クラスターは，外界の酸素条件や光条件などにより精緻に制御されている[3)]．特に，バクテリオクロロフィル生合成系遺伝子 *bch* 群の同定は，その後の植物のクロロフィル生合成系の解明への道しるべとなった[4)]．筆者らは，バクテリオクロロフィル生合成系のプロトクロロフィリド還元酵素の生化学的解析のために，*R. capsulatus* を用いたタンパク質の大量発現系を確立してきた[5,6)]．*R. capsulatus* は，培養が容易であり，世代時間も比較的短く，高い細胞濃度まで培養できることから，光合成関連タンパク質のみならず膜タンパク質を含むさまざまなタンパク質の大量発現系として有望な系である[7)]．本節では，*R. capsulatus* の発現ベクター系と形質転換系，特定の遺伝子破壊株の単離方法について紹介する．

**表 1**：*R. capsulatus* で用いられる抗生物質とその濃度

| 抗生物質 | ストック溶液 | 使用濃度（$\mu$g/ml） | 備考 |
|---|---|---|---|
| カナマイシン | 10 mg/ml$_{water}$ | 10.0 | |
| スペクチノマイシン | 10 mg/ml$_{water}$ | 10.0 | |
| ゲンタマイシン | 20 mg/ml$_{water}$ | 0.5 | |
| ストレプトマイシン | 50 mg/ml$_{water}$ | 0.5 | |
| リファンピシン | 50 mg/ml$_{DMSO}$ | 100 | SB1003 由来の株は Rif$^{R}$ で，接合の際に含まれる *E. coli* の生育を阻害し，形質転換体の単離を容易にしている． |

1）名古屋大学大学院生命農学研究科；さきがけ・JST
2）名古屋大学大学院生命農学研究科；日本学術振興会特別研究員

## 8.2 *R. capsulatus* における大量発現ベクター

*R. capsulatus* でのタンパク質大量発現のためのベクターとして，筆者らが構築し活用しているpJN3とpJNYを図1に示す．これらのベクターは，多様な原核生物において複製維持が可能な広宿主域ベクターpBBR1-MCS2[8]から構築した．タンパク質の大量発現系では，どのようなプロモータを利用して目的タンパク質の発現を誘導するかが重要である．pJN3とpJNYでは*puc*プロモータを利用している．*puc*プロモータは，光合成遺伝子クラスターにおいて集光性バクテリオクロロフィル結合タンパク質をコードする*pucAB*の発現を制御しており，嫌気条件に応答して強く転写が誘導される[9]．さらに，目的タンパク質をより簡便，迅速に精製するために，N末端にアフィニティタグが付加されるような塩基配列が開始コドンの直後に挿入されている．pJN3ではHisタグ（6 xHNタグ）が，pJNYではStrepタグがN末端に付加されるように設計されている．クローニング部位は，pJN3では*Kpn*I，pJNYでは*Bam*HI-*Kpn*Iである．薬剤耐性マーカーとして元のベクターが有していたカナマイシン耐性に加えて，新たにスペクチノマイシン耐性遺伝子を付加している．

## 8.3 *R. capsulatus* における形質転換系

*R. capsulatus* の形質転換（構築した発現ベクターの*R. capsulatus* への導入）は，*E. coli* との接合を利用する．*R. capsulatus* に導入したいプラスミドを有するドナー*E. coli* と接合を誘発するヘルパー*E. coli* および，プラスミドを導入したいレシピエント*R. capsulatus* という3者で行うことからtriparental matingとよばれる方法である[10]．ドナー*E. coli* は，JM105などプラスミド構築に使う*E. coli* であり，ヘルパー*E. coli* はヘルパープラスミドpDPT51をもつXL1-Blue，DH5，C600などが使われる．また，最終的な発現宿主となるレシピエント*R. capsulatus* は，*puc*プロモータが野生株よりもより強く誘導されるDB176を使うが，当然，野生株やさまざまな変異株でも利用できる．

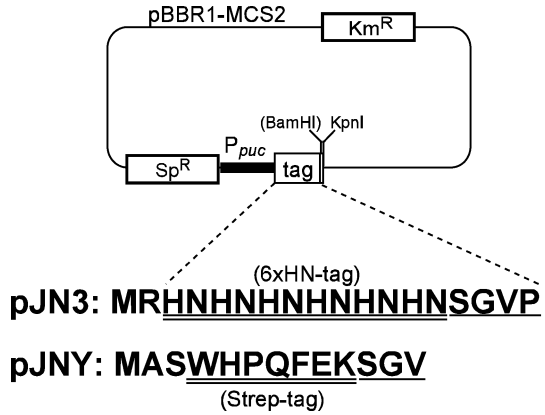



**図1：*R. capsulatus* 発現用プラスミドpJN3とpJNY**
広宿主域ベクターとして開発されたpBBR1-MCS2のマルチクローニング部位に，スペクチノマイシン耐性カートリッジ，*puc*プロモータ，開始コドンに続くアフィニティタグをコードする配列を挿入して構築した．pJN3では*Kpn*Iをクローニング部位，アフィニティタグとしてHisタグ（HNタグ）が，pJNYでは*Bam*HIと*Kpn*Iをクローニング部位，アフィニティタグとしてStrepタグが付加される．

### 8.3.1 使用する菌株

1．遺伝子破壊用プラスミドを持つ*E. coli* JM105など
2．ヘルパー*E. coli* XL1-Blue/pDPT51，DH5/pDPT51など
3．レシピエント*R. capsulatus* DB176など
4．GTA大量生産株*R. capsulatus* R121など（後述；8.4参照）

### 8.3.2 *R. capsulatus* 培養用培地と溶液

RCV培地（1 l）

| | |
|---|---|
| 10%リンゴ酸（DL-malic acid） | 40 ml |
| 10%（$NH_4$）$_2SO_4$ | 10 ml |
| 0.64 M $KPO_4$[注1] | 15 ml |
| 150 μg/ml D-ビオチン | 0.1 ml |
| Super Salts solution[注2] | 50 ml |

PY培地（1 l）

| | |
|---|---|
| Peptone | 3.0 g |

[注1] 0.64 M $KPO_4$（500 ml）

| | |
|---|---|
| $KH_2PO_4$ | 20 g |
| $K_2HPO_4$ | 30 g |

[注2] Super Salts solution（500 ml）

| | |
|---|---|
| 1% EDTA | 20 ml |
| 20% $MgSO_4$・7 $H_2O$ | 10 ml |
| 7.5% $CaCl_2$・2 $H_2O$ | 10 ml |
| 0.5% $FeSO_4$ | 24 ml |
| 1 g/l thiamine-HCl | 1 ml |
| Trace Elements*** | 10 ml |

*** Trace Elements（200 ml）

| | |
|---|---|
| $Na_2EDTA$ | 2.5 g |
| $MnCl_2$・4 $H_2O$ | 0.2 g |
| $H_3BO_3$ | 0.1 g |
| $Na_2MoO_4$・2 $H_2O$ | 0.1 g |
| $ZnCl_2$ | 0.05 g |
| $NiCl_2$・6 $H_2O$ | 0.05 g |
| $CoCl_2$・6 $H_2O$ | 0.02 g |
| $CuCl_2$・2 $H_2O$ | 0.01 g |
| $Na_2SeO_3$ | 0.005 g |
| $NaVO_3$・n$H_2O$（meta） | 0.005 g |

Yeast extract　3.0 g

各培地ともに，寒天培地には agar　1.5%，重層用のソフト寒天には 0.8%になるように BactoAgar (Difco) を添加してオートクレーブする．

1 x GTA バッファー

10 mM Tris-HCl；pH 7.8

1 mM $MgCl_2$

1 mM $CaCl_2$

1 mM NaCl

500 μg/ml BSA

### 8.3.3　器具装置

小型冷却遠心機

インキュベータ（*R. capsulatus* 用 34°C, *E. coli* 用 37°C）

GasPak（*R. capsulatus* の光合成条件での培養用；BBL GasPak 100 anaerobic systems, Becton Dickinson and Company, Sparks, MD；嫌気性細菌培養用の専用容器）

### 8.3.4　実験操作

まず，ドナー*E. coli*，ヘルパー*E. coli* および，レシピエント *R. capsulatus*（PY 培地）を一晩培養する．翌朝，ドナー，ヘルパー両 *E. coli* の各培養液 500 μl を SOC 液体培地 5 ml（抗生物質を加えないこと）に植え継ぎ，培養する．*R. capsulatus* の培養はそのまま継続する．2 時間後，ドナー，ヘルパー，レシピエントの三者を各 2 ml ずつボトルトップフィルター（0.22 μm，cellulose acetate membrane, CORNING など）上に吸引する（アスピレータ使用）．1 分間吸引した後に滅菌したメスを用いてフィルターメンブレンを切り取り，菌体が乗った面が上になるように PY 寒天培地（抗生物質を含まない）に乗せ，暗所で 34°Cにて保温する．5 時間後，菌体が乗ったフィルターメンブレンをプレートから剝がし，50-ml 滅菌遠沈管（CORNING など）に移す．遠沈管に PY 液体培地を 2 ml 入れ，ふたを閉めてよくボルテックスしフィルターメンブレン上の菌体を培地に再懸濁する．その後，フィルターメンブレンを取り除き，懸濁液の入った遠沈管に PY ソフト寒天（リファンピシン 0.5 mg/ml，カナマイシン 5 μg/ml，スペクチノマイシン 10 μg/ml を含む）を 4 ml 加え，素早く PY 寒天培地（抗生物質は必要に応じて含む）に移し，前後左右に傾けて均一になるように広げる．固まりやすいので素早く行う．重層したソフト寒天が固化したら，暗所 34°Cにて保温する．通常 3 日後ソフト寒天中に 5000 個以上のコロニーが生じるが，その中には目的とする形質転換体の他にドナーとして用いた *E. coli* のコロニーも混ざっている．そこで，次は *R. capsulatus* のコロニーのみを選別し，単離を行う．実体顕微鏡下で見ると，ソフト寒天中では *E. coli* のコロニーが球状であるのに対し，*R. capsulatus* のコロニーは輪郭がはっきりとしたラグビーボールのような形なので容易に区別できる．後者のようなコロニーを，爪楊枝を用いてピックアップし，PY 寒天培地上でシングルコロニーを形成，単離する．

## 8.4　*R. capsulatus* における特定遺伝子破壊

*R. capsulatus* における特定の遺伝子の破壊についても，前述した接合によって遺伝子破壊用のプラスミドによる形質転換でも原理的には可能である．しかし，遺伝子導入効率が低いため必ずしもうまくいかない場合がある．そこで，*R. capsulatus* では，GTA というファージ様粒子を利用した遺伝子破壊法が用いられる．GTA（Gene Transfer Agent；GTA）とは，*R. capsulatus* に特有のファージ様粒子のことである[11]．GTA は，リファンピシン耐性をもつ株の培養液（0.45 μm フィルター濾液）からリファンピシン感受性株を耐性化する因子として発見された[12]．GTA は，ファージ様粒子で，ドナーとなる細胞のゲノム DNA からランダムに 4.5 kb 断片を切出しビリオン粒子に取り込んで細胞外に出て，レシピエントとなる細胞に付着してビリオン内の DNA を注入する[13]．GTA は，ファージではなくレシピエント細胞を溶菌するような作用は示さないが，DNA 注入の結果，レシピエント細胞のゲノムとの間で相同組換えが誘発される．ドナー細胞におけるランダムな DNA 断片の切り出しとパッケージングは，ゲノムと同様にプラスミドに対しても行われることから，特定の遺伝子を薬剤耐性遺伝子によって破壊した変異株を単離するための高効率な遺伝子導入法として GTA が広く活用されている[14]．野生株は GTA を少量しか生産しないため，GTA の解析のために GTA を大量に生産する特別な変異株 Y262 が単離された[15]．その後，この株を遺伝子操作に利用しやすくするため，GTA 大量生産能に加えてカロテノイド生合成系の変異 *crtG121* をもつ株 R121（カロテノイド生合成系遺伝子 *crtG* の変異のため緑色のコロニーを形成する）やリファンピシン耐性の CB1127 などが単離され，活用されている．

### 8.4.1　*破壊用プラスミドによるヘルパーE. coli の形質転換*

ヘルパー*E. coli*（XL1-Blue/pDPT51 または DH5/pDPT51 など）を遺伝子破壊用プラスミド（ターゲットの遺伝子を薬剤耐性カートリッジで分断したプラスミ

ド）により形質転換する．この形質転換は，塩化カルシウム法などの定法でも上述の接合による方法でも可能である（図2 AおよびA'）．ヘルパー*E. coli* の保持するヘルパープラスミド pDPT51 は，トリメトプリム耐性をもつので，培養の際には 50 μg/ml のトリメトプリム（ストック溶液 10 mg/ml は DMSO に溶かす）を添加しておく．*R. capsulatus* の遺伝子破壊でよく用いられる薬剤耐性は，カナマイシン耐性，スペクチノマイシン耐性，ゲンタマイシン耐性などがある（表1）．ここでは，ゲンタマイシン耐性カートリッジを利用する場合を紹介する．

### 8.4.2 *R 121 株へのプラスミド導入*

*R. capsulatus* R121 を RCV 培地にて光条件下 34°Cでほぼ1日培養する．破壊用プラスミドをもつヘルパー*E. coli* を終夜培養（LB 培地 50 μg/ml トリメトプリムおよび 10 μg/ml ゲンタマイシン含有）する．ヘルパー*E. coli* を集菌し，同体積の RCV 培地で洗浄し，再度同体積の RCV 培地に懸濁する．RCV 寒天培地（抗生物質は含まない）に R121 の懸濁液を 200 μl ずつ何カ所かに分けてスポットする．それらのスポット上にさらにヘルパー*E. coli* の懸濁液 200 μl をスポットする．クリーンベンチなどでしばらくシャーレのふたを開けてスポットを乾燥させた後，暗所 34°Cにて 5 時間インキュベートする．この間に，R121 とヘルパー*E. coli* との間で接合が起こり，ヘルパー*E. coli* の保持する遺伝子破壊用プラスミドが R121 細胞へと移動する（図2 B）．次に，ゲンタマイシン 5 μg/ml を含むソフト寒天（0.8%）RCV 培地 4 ml を重層する．光合成条件（明所嫌気条件）にて 3 日程度培養する．R121 特有の緑色のゲンタマイシン耐性コロニーが多数出現する．これが遺伝子破壊用プラスミドをもつ R121（図2 C）であり，この株から GTA を調製する．

### 8.4.3 *R 121 から GTA 調製*

ゲンタマイシン耐性 R121 を RCV 培地で一旦生育させて，1/20 容の割合で PY 培地に植菌し，光条件にて 34°Cで培養する．細胞の増殖が静止期に達したところで（植菌後 1 日～2 日），2 ml の培養液を 0.45 μm フィルター（Sterile Ascodisc 0.45 μm；Gelman Science など）でろ過し，濾液を回収する（図2 D）．この濾液に GTA が大量に含まれている．濾液の 1/9 容の 10 xGTA バッファーを添加し，数時間以内に使用する場合は氷上で保存，また長期保存する場合はこのまま－80°Cで凍結する．

### 8.4.4 *GTA による形質転換*

レシピエントとなる *R. capsulatus* を PY 培地で培養する．この培養液 4 ml を遠心により集菌し，細胞ペレットを同体積の 1 xGTA バッファーに懸濁する．このレシピエント細胞の懸濁液 100 μl と上記の GTA 濾液 100 μl および 400 μl の 1 xGTA バッファーを混合（GTA はガラス表面に吸着しやすいので，ガラス容器は使わずにプラスチック製の容器を用いる．）し，35°Cで 1 時間静置する（図2 E）．この混合液を 2.5 ml のソフト寒天（0.8%）PY 培地と混ぜて，PY 寒天培地上に重層し，34°Cで 4 時間培養する．その後，形質転換体を選抜するためにゲンタマイシン（6.7 μg/ml）を含むソフト寒天 PY 培地を重層（寒天培地全体に希釈されると 0.5 μg/ml 程度になる）し，34°Cで培養する．この間に，GTA から導入されたゲンタマイシン耐性遺伝子をもつ DNA 断片がレシピエント細胞に導入され，ゲノム上のターゲット遺伝子の野生株コピーと相同的組み換えを起こし，破壊遺伝子コピーと入れ替わる（図2 F）．3 から 4 日後，生じてきたゲンタマイシン耐性のコロニーが目的とする遺伝子

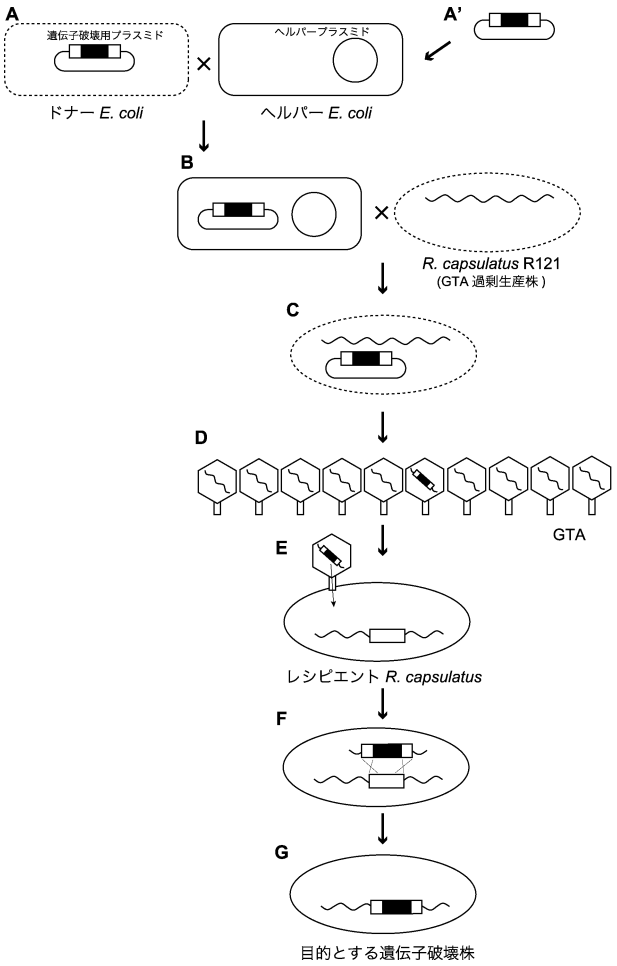



**図2：***R. capsulatus* における GTA を用いた特定遺伝子破壊株の単離
破壊しようとするターゲット遺伝子を白いボックス，遺伝子破壊用の薬剤耐性カートリッジを黒いボックスで示した．*E. coli* は角の丸い四角形で，*R. capsulatus* は楕円形で表した．（詳細は本文参照）

破壊株と考えられる（図２G）ので，コロニーPCR などにより遺伝子破壊を確認する．

## 参考文献


1）M. T. Madigan, & D. O. Jung, The purple Photosynthetic Bacteria, eds. C. N. Hunter, F. Daldal, M. C. Thurnanuer & J. T. Beatty, Dordrecht, Springer Science ＋ Bussiness Media B. V., 2009, p.1.

2）J. F. Imhoff, Anoxygenic Photosynthetic Bacteria, eds. R. E. Blankenship, M. T. Madigan & C. E. Bauer, Dordrecht, Kluwer, 1995, p.1.

3）S. Elsen, L. R. Swem, D. L. Swem, & C. E. Bauer, Microbiol. Mol. Biol. Rev. **68** (2004) P.263.

4）D. W. Bollivar, J. Y. Suzuki, J. T. Beatty, J. M. Dobrowlski, C. E., & Bauer, J. Mol. Biol. **237** (1994) P.622.

5）J. Nomata, L. R. Swem, C. E. Bauer, & Y. Fujita, Biochim. Biophys. Acta **1708** (2005) P.229.

6）J. Nomata, M. Kitashima, K. Inoue, & Y. Fujita, FEBS Lett. **580** (2006) P.6151.

7）J. Nomata, T. Ogawa, M. Kitashima, K. Inoue, & Y. Fujita, FEBS Lett. **582** (2008) P.1346.

8）M. E. Kovach, P. H. Elzer, D. S. Hill, G. T. Robertson, M. A. Farris, R. M. Roop II, & K. M. Peterson, Gene **166** (1995) P.175.

9）D. G. Nickens, & C. E. Bauer, J. Bacteriol. **180** (1998) P. 4270.

10）D. P. Taylor, S. N. Cohen, W. G. Clark, & B. L. Marrs, J. Bacteriol. **154** (1983) P.580.

11）A. S. Lang, & J. T. Beatty, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **97** (2000) P.859.

12）B. Marrs, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **71** (1974) P.971.

13）P. A. Scolnik, M. A. Walker, & B. L. Marrs, J. Biol. Chem. **255** (1980) P.2427.

14）P. A. Scolnik, & R. Haselkorn, Nature **307** (1984) P. 289.

15）H. C. Yen, N. T. Hu, & B. L. Marrs, J. Mol. Biol. **131** (1979) P.157.

# 6章
# バイオインフォマティクス

# 1．比較ゲノムによる光合成関連遺伝子の推定

佐藤　直樹[1)]

真核光合成生物の光合成関連遺伝子はシアノバクテリアから細胞内共生によってもたらされたものが多く，これらは比較ゲノムによる知識発見の最適なターゲットである．ゲノムの比較を効率的に行うことにより，相同タンパク質遺伝子を的確に発見し，その機能解析を行う方法について述べる．

## Comparative genomics of photosynthesis-related genes

Naoki SATO

A method of comparative genomics using all-against-all comparison is used to infer photosynthesis-related protein-coding genes.

### 1.1　はじめに

酸素発生型光合成は，シアノバクテリアで成立し，細胞内共生によって藻類・植物にもたらされた．今のところ，*Paulinella* など一部の例外を除いて，すべての色素体は単一の起源をもち，単一の一次共生に由来すると考えられている．一方，二次共生，三次共生は複数回起こったと考えられている．このような大規模な遺伝子の流入は，遺伝子の水平伝達の著しい例であり，主要な光合成関連遺伝子は基本的にこの水平伝達の産物と見ることができる．現在の藻類や植物の色素体には小型のゲノムが含まれているが，そこにコードされる遺伝子は緑色系統で100足らず，紅色系統でも200程度の数に過ぎない．シアノバクテリアのゲノムはもっとも小型のものでも約1.7 Mbp程度あり，約1700個程度の遺伝子を持っている．従って，細胞内共生によって真核光合成生物にもたらされた遺伝子の多くは消滅したか細胞核に移行したと考えられる．このように，色素体または葉緑体で働いているタンパク質の総数は2000個とも3000個とも推定されているが，その半数はシアノバクテリア起源で，その大部分が細胞核コードと考えられる．では残りの半数は何かということだが，これらは進化の過程で真核起源のタンパク質が，遺伝子重複や二重ターゲティングなどによって，色素体でも機能するようになったものと考えられる．このように起源の異なるタンパク質が協力して色素体を機能させているのが，真核光合成生物，特に被子植物の特徴である．こうした起源の異なるタンパク質を見分けて手っ取り早く調べる手段はないか，という考えのもと，ゲノムをうまく比較しようという取り組みが始まった．本項では，ゲノムを比較する情報的な手法について，簡単に紹介する．

1）東京大学大学院総合文化研究科

### 1.2　比較ゲノムの基本的手法

コンピュータを用いた遺伝子データの解析は今ではごく当たり前のものになっているが，それでも「これはバイオインフォマティクスを用いてみつけました」などという言葉が未だに横行している現実は嘆かわしい．結局のところ，コンピュータを使おうが，いわゆるインフォマティクスを使おうが，自分で何をやっているのかを把握していることが大切で，それは実験と何も変わらない．キットを使った実験と誰かが作ったソフトウェアを使ったインフォマティクス，どちらも本質を理解しなければ，ただ手を動かしているだけである．そこで，勘所をいくつか押さえておこう．(1)バイオインフォマティクスを使っても，理にかなわないことはできない．(2)原理のないアルゴリズムは存在しない．(3)少しだけ「情報」を理解しよう．

いくら原理を理解するといっても「情報」とは何かという根本を理解しないでは無理である．「情報は乱雑さの対数に比例し，符号を変えたもの」ということをおさえていれば十分である．対数の底として2を使うと，情報の単位は「ビット」になる．簡単にいえばエントロピーと情報は符号が違うだけで同じものということができる．では遺伝情報とはなにか．よく転写因子の結合配列として途中にたくさんXを書いて，実質的に4塩基程度で決まるコンセンサス配列を出している発表をみることがある．どんなにXを並べてもこれには情報はない．従っ

て，4塩基が持ちうる情報量は4の4乗の対数，つまり$\log_2(2^8)=8$ビットである．何のことはない，パソコンのメモリの一番小さな単位程度でしかない．256通りの中から1つを選択する程度の情報量では，大きなゲノムの中から特定の遺伝子を選択するには少なすぎるということになる．最近では誰でも使うBLAST検索[1]でででてくる$E$値[2]というのがある．ウェブサーバーの画面では1.0 e-25などと書かれているので，自然対数の底を使った指数かと思うかもしれないが，これはコンピュータの世界での表現法であって，中身は$1.0\times10^{-25}$のことである．$E$値というのは2つの配列が似ているときに，他人のそら似で偶然似ている確率がこのくらいであるということを意味する．言い換えると，系統関係がないのに似ている確率がこのくらい低いということである．だから系統関係がわかっているときにこの値で議論するのはおかしいことになるのだが，実は$E$値を計算するときには，類似関係の指標である$p$値から極限分布の計算で求めるのである[2]．従って類似度の尺度として$E$値を使っていても構わないことになる．いずれにしても情報量に変換するには対数をとるので，結局べき乗の値の大小で考えればよいことになる．そのままの数として考えれば，$10^{-20}$と$10^{-100}$では，どちらもとても小さいだけであるが，情報量として考えれば，後者は前者の5倍の情報を持っていることになる．BLASTの理論では配列の長さによる補正が入っているので，配列の長さは関係ないはずであるが，現実には，長い配列ほど$E$値のべき乗の値の絶対値が段違いに大きくなっている．まとめると，バイオインフォマティクスといっているものは実質的には確率計算に尽きるということで，そこで観察されている事象が偶然おきる確率がいかに低いかを客観的に記述する手法ということができる．相同性など情報関係の基本事項は，私が担当している講義の講義録でも説明しているので参照していただきたい（http://nsato4.c.u-tokyo.ac.jp/old/Kougi/Tokuron.pdf）．

## 1.3 Gclustを用いた系統解析

BLASTは便利であるし，NCBI（http://www.ncbi.nlm.nih.gov/）などのサイトを使うと，ものの数十秒で答えが返ってくるという信じられないような優れものである．しかし，世界中で爆発的に増え続けている遺伝子情報の蓄積の結果，検索によってでてくるものもまた膨大となり，手っ取り早く自分が知りたいホモログ探しができなくなってしまった．そこには明らかに同一とわかる配列がトップにでてくる以外，さまざまな生物の配列が連続的な$E$値のならびに従って表示されている．これでは，どれが自分の捜したいホモログであるのかも容易にはわからなくなってしまった．そこで，一つ便利なのが，繰り返し検索をしてくれるPSI-BLASTなどの新たなツールである[1]．繰りかえすことで，曖昧な類似性の中から，確実なものを特にピックアップするようにできている．それでも同じ生物や近縁生物の配列がいくつも連続して出力されるという不便さは解消しない．

これに対し，ゲノム配列が決められた生物のデータだけを使って類似配列を見つければ，このような多数の候補に悩まされる問題はなくなる．調べたい生物に目的のホモログがあるかないかだけが明確にわかる．これがGclust[3]をはじめとする検索サーバーである．理研のSABRE（http://saber.epd.brc.riken.jp/SABRE0101.cgi），ペンシルベニア大のChloroplastDB（http://chloroplast.cbio.psu.edu/）なども類似の機能をもつ．これらはBLASTで得られた情報を更に加工して検索配列と類似の配列を予め計算しておき，ユーザーからの問い合わせに応じてデータを出力する．Gclustの特徴は，ゲノムが解読された何十種類の生物がコードすると推定されるすべてのタンパク質配列について，全対全のBLASTP検索を行い，その結果をもとに，相同なタンパク質のグループをまとめてあることである[4]．主な利用方法として，相同タンパク質を手軽に集めて系統解析や配列比較をすることと，特定の生物群を指定して，それらに共通に存在するタンパク質を検索することがある．日本語で書かれたサーバーの詳しい使用方法は，サーバーのトップページ（図1；http://gclust.c.u-tokyo.ac.jp/）からダウンロードできる．類似タンパク質のクラスターとしては，NCBIで作られたCOG（Clusters of orthologous groups of proteins：http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG/）が有名であるが，14生物群のうちの3群以上に保存されたタンパク質に番号をつけたもので，この定義から，光合成関連のタンパク質は基本的に含まれていない．未だにCOGとの相同性に基づいたタンパク質の分類が行われているのをみることがあるが，本来，解析対象となる生物を含んだ生物群の総当たり解析を行わなければ正しいタンパク質の分類は難しいことに留意すべきである．こうした点で，植物関連分野では，既存の相同タンパク質データベースが必ずしも役に立たないことも多い．

まず，相同タンパク質配列を検索し，それを用いて系統樹を作成する方法を説明する．従来は，NCBIなどのBLAST検索サイトで得られた相同タンパク質のリストの中から，好きなものを選んで配列をダウンロードして，

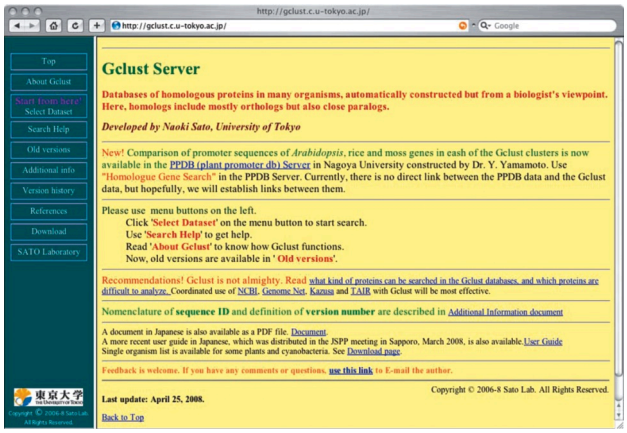



図1：Gclust サーバーのトップ画面
現在のバージョンでは，PPDB へのリンクも表示している．通常のサーチは Select Dataset から始める．古いバージョンのデータセットは，Old versions から選択する．データ全体もダウンロード可能で，展開後，PERL などを利用して処理すればよい．データセットを作るのに用いた具体的なゲノムについては，Version history にある．日本語のマニュアルは黄色い画面の下の方のリンクを使って取得できる．

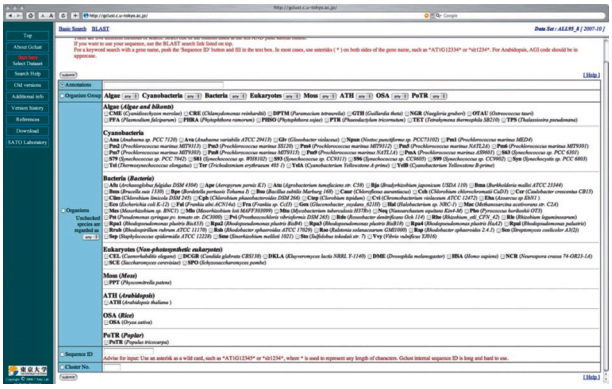


図2：Gclust サーバーにおける ALL95_4 データセットのサーチメニュー画面
大きな画面なので，スクロールして下の方を見せているため，一番上にある Search Menu という文字は隠れている．キーワードによるサーチの他，生物群特異的なタンパク質遺伝子のサーチのため，生物種のリストと生物群の定義が示されている．

ClustalX[5]（http://bips.u-strasbg.fr/fr/Documentation/ClustalX/）などを使ってアラインメントや系統樹を作っていたのではないだろうか．Gclust では，保存性の高いタンパク質では厳しい閾値を，保存性の低いタンパク質では緩い閾値を設けることによって，選んだ生物群のそれぞれから相同タンパク質がひととおり出てくるようにしている．よく似たパラログがある場合にはそれらも含まれるので，普通の意味でのオルソログだけではない．Gclust サーバーを使った相同タンパク質群の検索について，以下に簡単に説明する．

(1) まず，Gclust のトップページ（図 1）にアクセスし，左のメニューから Select Dataset を選ぶ．Start here とハイライトしたボタンである．

(2) ALL95_4 の左のラジオボタンをクリックすると，Search Menu の一覧が出てくる（図 2）．いろいろな検索の仕方を選ぶことができる．

(3) 次の 3 通りの方法のどれかで検索の元になる配列を入力する．

(a) 配列名：シロイヌナズナまたはシアノバクテリアの遺伝子名（Locus tag など）がわかっている場合，下の方の Sequence ID という項目のラジオボタンを押し（2 とは異なり，押しただけでは先に進まない），右側の記入欄に遺伝子名を記入する．その際，シロイヌナズナなら AGI コード（半角大文字）を使い，その前後を半角（英文字）のアステリスクではさむ．例：*AT1G12340*．

シアノバクテリアの場合，*Synechocystis* sp. PCC6803 であれば同様に，*slr1234* のようにする．

上か下の端にある submit ボタンを押すと，Search Results が表示され，さまざまなタンパク質グループの一覧表が出てくる．たいていは 1 つだけが表示されるので，Cluster number をクリックすると，相同タンパク質の一覧（図 3 に例を示す）が出てくる．

(b) アノテーション：一番上の Annotations という欄で，左のラジオボタンをクリックした上で，右の欄に「DNA polymerase」など，タンパク質を表す言葉を入れる．上か下の端にある submit ボタンを

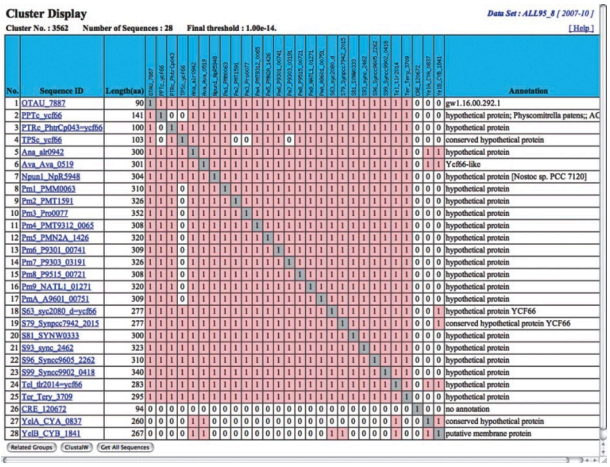



図3：Gclust サーバーにおける相同タンパク質グループの表示
サーバーでは Cluster と表現している．配列数が多いときには，このような類似度マトリクスではなく，単なるリストとして表示される．

押す．Search Results が表示され，さまざまなタンパク質グループの一覧表が出てくる．たくさんの相同タンパク質を集めたものがそれぞれのグループで，Cluster number が割り当てられ，それぞれ 1 行で表示されている．目的のものと関連すると思われる Cluster number をクリックすれば相同タンパク質の一覧表が表示される．

注意点として，Gclust サーバーで利用した元のデータベースが作られたあとで決められたアノテーションや遺伝子名はキーワードとして使えない．いまはシロイヌナズナならば基本的にすべてのタンパク質配列に AGI コードがあるが，機能がわかると新たに遺伝子名がつけられ，中にはあえて AGI コードを書かない論文もある．こうしたタンパク質の相同性を調べたい場合，新たにつけられた遺伝子名や酵素名ではなく，NCBI などのデータベースから別途取得した配列を利用して，(c) に従って検索すれば，本来の AGI コードがわかり，相同タンパク質もすぐにわかる．

(c) 配列名のわからないアミノ酸配列または DNA 配列があるときや，Gclust データベースには含まれていない生物の配列を使って，それと似た配列が含まれるクラスターを探すことができる．そのためには，Search Menu の画面で上の方にある BLAST というボタンをクリックする．そうすると，BLAST 検索の画面に変わる．ここで，手持ちの配列をペーストし，左上の Program の選択を行う．いまペーストした配列がタンパク質配列なら blastp，DNA 配列なら blastx を選ぶ．多くの場合，その他の設定は既定のままでよい．Run BLAST のボタンを押し，しばらくすると類似配列のリストがでてくる．その中で，上位の配列名をクリックすると，その配列を含むクラスター名が表示され，さらに Cluster number をクリックするとそのクラスターに含まれる相同タンパク質の一覧表が表示される．

(4) 相同タンパク質の一覧表では，メンバー数が多いクラスターの場合，配列名，アミノ酸残基数，元のデータベースにおけるアノテーションの 3 つが表示される．このうち，元のデータベースのアノテーションは必ずしも正しくないことがあるので，これを見ておかしいと思う必要はない．個々の配列は Sequence ID をクリックすると表示される．配列数が少ない場合には，相互の類似度を示すマトリクスが表示される（図 3）．この場合，一番上に表示された $E$ 値を基準としてそれよりも低い場合（よりよく似ている場合）には 1 が，そうでない場合には 0 が，それぞれ表示される．対角線（同じ配列同士）であっても 0 が書かれていることがあるが，これは短い配列の場合に起こりうるので，エラーではない．

(5) 前項で表示された配列が，検索配列の類似配列である．しかし，期待したものがない場合もある．これは配列をクラスター化する際に，できるだけよく似たものだけでまとめているため，少し異なるパラログや長さの異なる配列，ドメインが余分にある配列などが排除されるためである．下の方に Related groups というボタンが表示されていれば，こうした排除された配列があることがわかり，このボタンをクリックすると，それらのリストが表示される．

(6) 相同配列を集めて系統解析をする場合，配列数が少なければ，下の方の ClustalW というボタンを押すと，アラインメントが表示される．また，その画面で，上の方のコーヒーカップの絵をクリックすると，Jalview[6] が起動し，色つきのアラインメントと簡易系統樹が表示される．配列や種名を選択すると，さまざまにハイライトを変えることができる．

(7) 配列数が多いときには，ClustalW はできない旨の表示がでる．この場合には，先の配列リストの表示の下の方にある Get All Sequences というボタンをクリックする．これで，クラスター内のすべての配列が FASTA 形式で表示されるので，テキストファイルとして保存すればよい．保存した配列をもとに，手元のマシンを使って ClustalX[5] によりアラインメントを作成し，さらにさまざまなソフトを使って系統解析をすることができる．ただし注意すべき点がある．それは配列名がかなり長いため，ソフトによっては配列名を途中で切り捨ててしまうことで，その場合，同じ名前の配列が複数できるため，その先の処理に支障がでることがある．たとえば，Phylip パッケージ[6] (http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html) や MAFFT[7] (http://align.bmr.kyushu-u.ac.jp/mafft/software/) などの場合，それぞれ 10 文字，15 文字で切り捨てている．私自身は，長い配列名に対応するように，これらの解析ソフトのソースコードを書き換えて対処している．TreeFinder[8] (http://www.treefinder.de/)，MEGA[9] (http://www.megasoftware.net/) などは，配列長に関しての問題はない．しかし，Gclust で用いている配列名（ゲノム名と配列の番号の組み合わせ）で，さらに既知の遺伝子名をイコール記号で付加している場合には，これが災いすることがある．また，イネなどの場合，元のデータベースに同一配列名

の異なる配列が含まれていたため，Gclust に取り込む際に，それらを区別するため，配列名の末尾に@0，@1などの文字を加えてある．これらイコール記号やアットマークは，ソフトによってはエラーの原因となる．その時は，テキストエディタソフトを使って無害な文字（アンダーバーなど）に一括変換する必要がある．系統解析の詳細はここでのテーマではないので，この程度にとどめておく．

## 1.4 Gclust を用いた系統特異的遺伝子の検索

Gclust がもつ本来の特色は，系統特異的に存在する遺伝子（タンパク質）の検索である．たとえばシアノバクテリアだけに保存されたタンパク質であるとか，シアノバクテリアと植物・藻類に共通なタンパク質とかを素早く発見するのである．それには 1.3(2) で表示されたメニュー（図 2）のうちで，Organism Group を選択するラジオボタンを押す．ここで Plants と Cyano を yes，その他を no として submit を押せば，植物・藻類とシアノバクテリアに共通でその他の生物にはないタンパク質グループが表示される．実際にやってみると 167 グループが表示される．意外と少ない．リストの中には，それぞれの生物群の中でそのタンパク質グループを含む生物種数が表示されている．ここで不思議に思うかもしれないのは選択していないはずの生物群でも，数が 0 になっていないことである．これは，検索において各生物群を構成する生物種の過半数に当該タンパク質グループが含まれるかどうかによって判別しているためである．その理由は，「存在しない」ということが必ずしも絶対的ではないからで，そもそもの原因は元のデータベースにおいてそのタンパク質が認識されているかどうかにかかっているためである．この過半数基準をユーザーが変えることは，このサーバー上ではできない．しかし，元のデータを使えば容易にできるので，その場合には，相談していただきたい．サーバー上の元データや，検索作業をするためのソフトウェア[4] は Gclust のウェブサイトで公開しているので，自前の UNIX マシン（Linux または MacOS X）があれば容易にできる．ちなみに今の 167 個のグループを見てみると，光化学系に関わる遺伝子名が目立つことがわかる．つまり，主だった光化学系タンパク質は既に見つかっているということになる．

図 4 には，少し前の CZ36 データセットを使って得られた光合成生物の間での相同タンパク質クラスターの共有関係が示されている．光合成生物共通のタンパク質は，

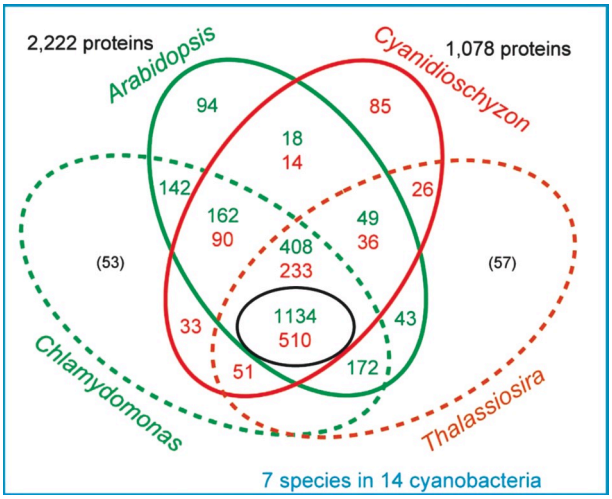



**図 4**：CZ36 データセットに基づく光合成生物の間の相同タンパク質共有関係
このデータセットには，14 種のシアノバクテリア，5 種の光合成細菌，7 種の色素体含有真核生物のほか，4 種の非光合成細菌と 4 種の非光合成真核生物，2 種の古細菌が含まれている．シアノバクテリアの過半数にあるクラスターが真核光合成生物にどのように共有されているかを示している．ここでは，シロイヌナズナ（緑または上段）とシアニジオシゾン（赤または下段）がもつ遺伝子数をそれぞれ示している．CZ36 データセットは Gclust サーバーの Old versions の中の 2007-06 にある．

中央上の部分で，シロイヌナズナで 408 個の遺伝子が含まれる．中央の丸はすべての生物に共通のクラスターを示し，そこに含まれるシロイヌナズナの遺伝子は 1134 個である．単細胞性紅藻シアニジオシゾンではだいぶ数が少ない．

Gclust では生物種を基準としているので，核ゲノムだけでなく葉緑体やミトコンドリアゲノムに含まれるタンパク質遺伝子も同等に扱われており，ある生物で葉緑体コードの遺伝子のホモログが他の生物では核コードであるというような事態も簡単に確認することができる．

## 1.5 Gclust と PPDB の連携によるホモログにまたがるプロモータの検索

こうしてホモログを集めると，プロモータも似ているのかということが気になる．Plant Promoter Database (PPDB)[10] を使うと，Gclust によって作られた相同タンパク質クラスターに含まれるシロイヌナズナ，イネ，ヒメツリガネゴケの 3 種の生物の遺伝子の 5' 上流領域の比較ができる．Gclust の各クラスターとの間での直接のリンクは今のところないが，PPDB のトップページ（http://ppdb.gene.nagoya-u.ac.jp/）で Homolog Gene Search という項目に AGI コードなどを入れることで，

直ちにホモログのリストが表示され，その中から選択したものについて，プロモータ領域に見られるモチーフがグラフィカルに表示される（図5）．3種のうちのどの遺伝子から検索してもそれを含む相同クラスタがでてくる．これだけ異なる植物の間なので，プロモータはあまり似ていないだろうと思われるかもしれないが，いろいろな例を試してみると，案外よく似たパターンがでてくるので，試してみるとよい．

## 1.6　おわりに

比較ゲノムは実際のところまだまだ開発途上にあり，どういう観点で何を比べるかということは知恵とセンスの問題であろう．ここで述べたのは，著者らが考える比較ゲノムの一例に過ぎない．光合成研究はもともと比較生物学的な観点があり，光化学系を解析するためには，植物もシアノバクテリアもともに活用してきた．これをゲノムのレベルでもやってみるというのはごく自然なことである．私たちも新しい光合成関連遺伝子の探索を進めていて，その成果の一部を最近発表しました[11]．またシアノバクテリアを中心としたCyanoClust（http://cyanoclust.c.u-tokyo.ac.jp/）も公開した．これを読んだ方々が新たなチャレンジを試みることに期待したい．

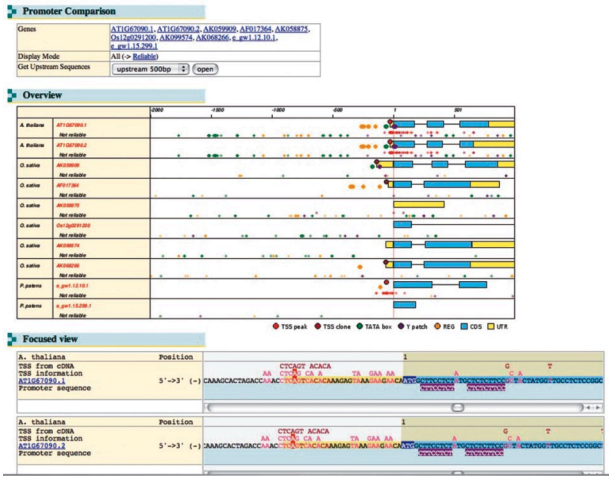



**図5**：PPDBによる比較プロモータ解析の画面の例
シロイヌナズナ，イネ，ヒメツリガネゴケの相同遺伝子の上流部に含まれるモチーフが色分けして示されている．いくつかは確かに共通したモチーフをもつように見える．

## 参考文献


1）S. F. Altschul, T. L. Madden, A. A. Schäffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, & D. J. Lipman, *Nucleic Acids Res*. **25** (1997) p.3389.

2）S. Karlin, & S. F. Altschul, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87** (1990) p.2264.

3）N. Sato, M, Ishikawa, M. Fujiwara & K. Sonoike, *Genome Inform*. **16** (2005) p.56.

4）N. Sato, *Bioinformatics*（オンライン版）doi: 10.1093/bioinformatics/btp047

5）J. D. Thompson, T. J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin, & D. G. Higgins, *Nucleic Acids Res*. **24** (1997) p.4876.

6）J. Felsenstein, *Cladistics* **5** (1989) p.164.

7）T. Katoh, *Brief. Bioinform*. **9** (2008) p.286.

8）G., Jobb, A. von Haeseler & K. Strimmer, BMC Evol. Biol. **4** (2004) 論文番号18.（ページではない）

9）S. Kumar, J. Dudley, M. Nei & K. Tamura Brief. Bioinform. **9** (2008) p.299.

10）Y. Y. Yamamoto & J. Obokata, *Nucleic Acids Res*. **36** (2008) p.D977.

11）M. Ishikawa, M. Fujiwara, K. Sonoike & N. Sato, *Plant Cell Physiol*.（オンライン版）doi: 10.1093/pcp/pcp027.

# 2．発現プロファイルの利用

遠藤　　剛[1)]，高林　厚史[2)]

高等植物，とりわけシロイヌナズナにおいて，公開マイクロアレイデータの蓄積が進み，最近ではそれらデータを光合成研究に取り入れる動きも出てきている．本稿ではそれらマイクロアレイデータの光合成研究への利用について概説する．

## Application of public microarray data to a photosynthesis study

Tsuyoshi Endo, Atsushi Takabayashi

Recently, a lot of microarray data is available in the public repositories recently.　Here, we briefly introduce you to how to use it and give you examples of how it is used in photosynthesis studies.

光合成においてモデル植物として用いられてきたのは，エンドウやホウレンソウなど，Ⅰ）入手や栽培が容易，II）無傷葉緑体の単離が容易，Ⅲ）サイズが大きい，等の条件を充たした植物であった．これは光合成研究の手法として主に物理化学的な測定や生化学的な解析が用いられてきた事が大きな理由であると考えられる．その後，形質転換が容易なタバコも光合成研究の材料として用いられるようになってきたが，状況が一変したのは2000年に高等植物として初めてシロイヌナズナの全ゲノムが解読されてからである．それ以来，光合成研究のモデル植物としてシロイヌナズナを選択し，その充実した変異株リソースを用いた逆遺伝学的に解析するアプローチが盛んに行われるようになってきた．さらに，マイクロアレイの発現データなど膨大なゲノムリソースが大量に公開されていることもシロイヌナズナを用いる利点と言えよう．

とりわけ光合成研究者にとって興味深い点は，核ゲノムコードの光合成遺伝子群は転写レベルで共発現（co-expressed）する傾向が見られる事である．これは他の代謝経路と比べて例外的なレベルといえ，光合成遺伝子群の発現調節を考える上でも大きな特徴であると共に，使い方しだいでは新規光合成遺伝子の同定につながる大変有益な情報である．実際，近年になって，蓄積された公開マイクロアレイデータを利用して，新規光合成関連タンパク質を同定したとの論文も報告されている（2.3参照）．そこで本稿では，光合成研究者を対象とし，公開マイクロアレイデータの利用法について概説する．

2.1章では，実際に公開マイクロアレイデータを用いて解析するために必要な3つのステップ，すなわち，Ⅰ）公開マイクロアレイデータの取得，II）データの前処理，Ⅲ）遺伝子発現解析，について概説する（図1）．

2.2章では，すでに解析済みの遺伝子発現データを公開しているデータベースを利用する事で，自ら解析する事なしで，公開マイクロアレイデータを利用する方法について紹介する．

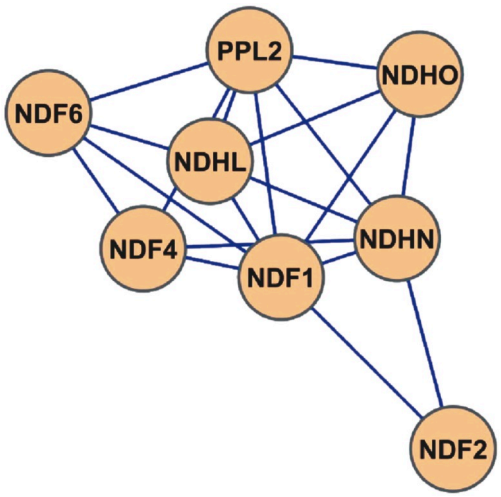



図1：新規 *NDH* 遺伝子候補の発現ネットワーク（r＞0.85）

1）京都大学大学院生命科学研究科
2）名古屋大学遺伝子実験施設（日本学術振興会特別研究員 PD）

2.3章では，実際に公開マイクロアレイデータを光合成研究に利用する際の参考に，筆者らの研究を含め，実際の研究例を紹介する．

## 2.1 公開マイクロアレイデータを用いた遺伝子発現解析について

様々な生物種においてゲノム情報が充実してきた今日では，ポストゲノム時代に向けてゲノムワイドな解析が広く行われるようになってきた．中でも良く用いられているのがDNAマイクロアレイを用いた包括的な遺伝子発現解析（トランスクリプトーム解析）である．DNAマイクロアレイは発現解析のみならず，ChIP-on-chip，SNP解析等，非常に幅広く用いられているが，ここでは発現解析に絞って簡単に紹介したい．

DNAマイクロアレイは2種類のタイプに大別される．Stanford大学のPat Brownらの研究グループによって開発されたcDNAスポットアレイ[1]と，Affymetrix社によって開発されたオリゴヌクレオチドアレイ[2]である．後者は一枚のアレイで発現が検出できる遺伝子数が多く，また，ターゲット配列に対して完全に相補的なPerfectMatch（PM）プローブと中央の一塩基のみをミスマッチさせたMissMatch（MM）プローブを比較する事で非特異的なハイブリダイゼーションの影響を排除できる事から，現在では主流となっている．ただし，一昔前に比べれば安価にマイクロアレイを利用できるようになってきたとはいえ，気軽に実験できる価格とは言えないため，筆者らの研究グループでは公開マイクロアレイデータを自分の研究目的のために利用させて頂いている．

### 2.1.1 公開マイクロアレイデータの利用法

多くのジャーナルでは，マイクロアレイを用いた大規模発現解析のデータを投稿するにあたって，MGED (Microarray Gene Expression Data) Societyが作成したMIAME（minimal information. about a microarray experiment: http://www.mged.org/Workgroups/MIAME/miame.html）ガイドラインに従い情報公開をする事が必要とされている．公開されたマイクロアレイデータの公的レポジトリとしてはアメリカNCBIのGEO（Gene Expression Omnibus），欧州EMBLのArrayExpress等が利用さられており，それらレポジトリにアクセスする事で登録されているマイクロアレイデータを入手する事が可能である．シロイヌナズナの公開アレイデータに関して言えば，NASCArrays（Nottingham Arabidopsis Stock Centre Transcriptomics Service）[3]がよく用いられている．

シロイヌナズナの公開マイクロアレイデータとして広く用いられているのが，AtGenExpressプロジェクトによって作成・公開されたデータセットである．AtGenExpressはシロイヌナズナの遺伝子発現データを網羅的に収集するための国際的なプロジェクトで日本の理化学研究所も中核的な役割を担った．このプロジェクトではAffymetrixのGeneChipであるATH1アレイが用いられており，2万以上のシロイヌナズナ遺伝子の発現を解析する事が可能になっている．AtGenExpressのデータは，TAIRもしくはNASCから入手可能である．また，NASCは現在でもAffymetrixのGeneChipを用いたシロイヌナズナの解析データを精力的に集積・提供し続けており，これら（AtGenExpress以外の）NASCArrayデータもよく用いられている．なお，現段階では，Affymetrix社以外の製品を用いたデータはほとんど登録されていない．

登録されたマイクロアレイデータを利用するときには，多くの場合バックグラウンド補正，および正規化等の前処理を行う必要があり，そのあとで発現解析を行う事になる．これらデータ解析のための商用ソフトとしてはGeneSpringやSpotfire等が知られているが，フリーのBioconductor（http://www.bioconductor.org/）もよく用いられるようになった．最近ではBioconductorについての日本語ドキュメントも多くなってきたため，解析は容易になってきたと言える．

### 2.1.2 前処理

マイクロアレイデータを用いて発現解析を行う際には，バックグラウンド補正や正規化などの前処理が必要となる．バックグランド補正はスポットのバックグランドの蛍光強度の影響を考慮し真のシグナル強度を検出するために必要であり，また正規化はデータの偏りを補正する事で，複数のマイクロアレイデータを相互に比較し定量的な検討を行うために必要な作業である．

前処理のためのアルゴリズムとしては，RMA（Robust Multi-array Analysis），MAS5（Microarray Analysis Suite），dChip（DNA-Chip Analyzer）などの数々の手法が知られており，それらはBioconductor等の解析ソフトを用いる事で容易に試す事ができる．なお，どのアルゴリズムを用いるか判断に迷った場合には，解析結果を比較した論文[4,5]が有益と思われる．いずれにせよ処理す

るアレイの枚数が多くなれば，実行にはその分だけ多くのメモリと時間を必要となるため，本格的な解析には相応のマシンパワーが必要になる．

### 2.1.3　遺伝子発現解析

マイクロアレイの一般的な使用法としては，まず興味のある遺伝子についての時系列や組織別の発現変動，ストレス応答など，ある実験条件で発現が有意に増減する遺伝子群を選抜する事が考えられる．これらの解析に関しては，例えば Bioconductor を用いる事で比較的容易に対応できる．

一方で，様々な実験条件で同じような発現プロファイルを示す遺伝子群は機能的に関連している可能性が高いと考えられるため，それを利用した未知遺伝子のアノテーションも試みられている．その試みの１つがクラスタリングであり，遺伝子群を発現プロファイルの類似性を指標にしてクラスタに分け，それらのクラスタ内の遺伝子は機能的に関連していると考える解析手法である[6]．具体的なクラスタリングの手法としては，階層的なクラスタリングや自己組織化マップ（self-organizing map；SOM）等があり，実際に光合成研究にも利用されている[7]．

いずれの手法においてもその類似性の比較に発現強度間の違いを基にした距離を利用しており，その遺伝子発現プロファイルの相似度の指標としては，ユークリッド距離だけでなく，ピアソンの相関係数やスピアマンの順位相関係数が用いられている．ユークリッド距離を用いる場合には発現データ値の大小が反映されるが，相関係数を用いる場合には相対的な増減・変動パターンの類似性が反映される．生物学的には発現レベルの絶対値（ユークリッド距離）よりも変化の方向（相関係数）が重要である場合も多く，そのような場合には発現プロファイルの相似度の指標として相関係数が用いられる．一方で，転写因子のように刺激に応答して発現強度が大きく変動するような遺伝子に着目する際には，ユークリッド距離が有用と思われる．

また，ある遺伝子と機能的に類似する遺伝子群を探索する目的であれば，単純にその遺伝子と相関係数が高い遺伝子群を探す事で充分である事も多い．実際に，筆者らはこの手法を用いて新規 *ndh* 変異株を同定している（後述）．

## 2.2　データベースの利用

実際に実験研究者が公開マイクロアレイデータを利用して大量解析を行おうとすると，数学やコンピュータの知識が要求される場面が少なくない．この障壁を乗り越えるためには，それ相応の時間が必要であり，その時間が取れない人は少なくないと思われる．しかし，最近のデータベースの充実により，公開データベースの利用により自ら解析せずとも典型的なデータ解析の多くは達成できるようになってきた．

典型的なデータベースでは，AtGenExpress 等のデータセットを用いて図１のような手順を踏んで大規模なデータ解析を行い，解析済みの遺伝子発現データを公開している．とりわけ，シロイヌナズナに関しては個性的なデータベースが次々と公開されているため，自分の目的に応じて使い分ける事が重要と思われる．

例えば，ある特定のシロイヌナズナの遺伝子の発現プロファイルを調べたいのであれば，eFP Browser（http://www.bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi）や Genevestigator（https://www.genevestigator.ethz.ch/）等を利用するのが容易であり，とりわけ Genevestigator を利用した解析は論文の Figure としてもよく利用されている印象がある．また，ある実験条件で発現強度が変化する遺伝子群を選抜したい場合には，DART（http://tabacum.agr.nagoya-u.ac.jp/dart/）が利用できる．

また，興味のあるシロイヌナズナの遺伝子と共発現している遺伝子群を選抜する目的であれば，ATTED-II（http://www.atted.bio.titech.ac.jp/）や CSB. DB（http://csbdb.mpimp-golm.mpg.de/），Cress Express（http://www.cressexpress.org/）などのデータベースが利用可能である．それらデータベースでは，興味のある遺伝子名を入力するだけでその遺伝子と高い相関係数を示す遺伝子群のリストを得る事ができる．とりわけ，光合成関連遺伝子においては機能的に関連する遺伝子群が高い相関係数を示すため，これらデータベースの利用は非常に有効である．例えば，実際に光化学系 II の遺伝子名を入れると，相関係数が高い遺伝子群のなかに光化学系 II の関連遺伝子群が含まれることが確認できるはずである．

いずれにせよ，データベースの進歩は日進月歩であり，すぐに情報は古びてしまうため，筆者は Nucleic Acid Research の Database issue などをチェックし，新しいデータベースや更新されたデータベースを自分で実際に試している．

## 2.3 光合成研究における発現プロファイルの利用法

ここでは実際に光合成研究において発現プロファイルを利用した研究について紹介する．

光合成研究に発現プロファイルを利用した先駆的な研究として Max-Planck 研究所の Dario Leister らの研究グループによる *pgrl1* 変異株の単離・同定が挙げられる．まず彼らはシロイヌナズナの公開マイクロアレイデータを利用してクラスター解析を行い，発現プロファイルの類似性を指標にしてシロイヌナズナの光合成遺伝子群のグループ分けを行った[7]．その結果，光合成関連遺伝子群と葉緑体リボソーム遺伝子群は共発現している傾向が見られ，しかも他の一般的な葉緑体タンパク質をコードする遺伝子群と異なった発現制御を受けている事を見出している．さらに彼らは，新規光合成関連と予想された遺伝子について変異株を利用して逆遺伝学的な解析を行い，光化学系 I 循環的電子伝達経路で機能している *PGR5* 遺伝子と相互作用する *PGRL1* 遺伝子の同定に成功している[8]．

*PGRL1* 遺伝子はシロイヌナズナで2コピー（*PGRL1A*，*PGRL1B*）存在し，両方の遺伝子機能を破壊する事で初めて表現型が現れるため，通常の変異株スクリーニングでこの遺伝子にたどり着くのは困難であると思われる．一方，Leister らの研究グループでは共発現解析であらかじめ遺伝子数を絞り込み *pgl1a*/*pgrl1b* の二重変異体を作成する事で，その変異株が *pgr5* と同様の表現型を示すことを見出した．この研究は光合成研究に発現プロファイル解析を組み合わせる事で研究効率を上げた好例と言えるだろう．

また，我々の研究グループでは光化学系 I 循環的電子伝達経路で機能する NAD (P) H Dehydrogenase（NDH）の未同定サブユニットの探索にこのアイディアを適用し，成果を挙げている．具体的には，まず，ATTED-II データベースを利用して既知の *ndh* 遺伝子（ndhL，ndhN，ndhO）と相関係数が高い遺伝子群のリストを作成した．また同時に，系統プロファイル法[9] を組み合わせ，シロイヌナズナ全タンパク質のうち，NDH 複合体を持っている生物種のゲノムにホモログが存在し，NDH 複合体を持たない生物種のゲノムにホモログが存在しないタンパク質のリストを作成した．

次に，作成したリストに含まれている遺伝子について，T-DNA が挿入されたシロイヌナズナ変異株を取り寄せ，実際に NDH 活性を測定した．その結果，NDH 活性が失われた新規変異株を5ライン得ることができた[10,11,12]．これら変異株の原因遺伝子群は相互に共発現しており（図 2），生化学的な解析からも NDH の新規サブユニットの可能性が高いと考えている．

これらの例は発現プロファイル，特に共発現に着目する事で，興味ある機能を有する光合成関連遺伝子の同定が従来法よりも迅速・簡便に行う事ができる可能性を示唆している．今後は，シロイヌナズナ以外の植物種においても公開マイクロアレイデータの数が増える事が予想され，ますますこの手法が重要になると期待される．

## 参考文献


1）M. Schena, D. Shalon, R. Heller, A. Chai, P. O. Brown, & R. W. Davis, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **93** (1996) P. 10614.

2）D. J. Lockhart, H. Dong, M. C. Byrne, M. T. Follettie, M. V. Gallo, M. S. Chee, M. Mittmann, C. Wang, M. Kobayashi, H. Horton, & E. L. Brown, Nat. Biotechnol. **14** (1996) P.1675.

3）D. J. Craigon, N. James, J. Okyere, J. Higgins, J. Jotham, & S. May, Nucleic Acids Res. **32** (2004) P.D575.

4）F. F. Millenaar, J. Okyere, S. T. May, M. van Zanten, L. A. Voesenek, & A. J. Peeters, BMC Bioinformatics. **7** (2006) P.137.

5）W. K. Lim, K. Wang, C. Lefebvre, & A. Califano, Bioinformatics. **23** (2007) P.i282.

6）J. Gollub, & G. Sherlock, Methods Enzymol. **411** (2006) P.194.

7）A. Biehl, E. Richly, C. Noutsos, F. Salamini, & D. Leis-

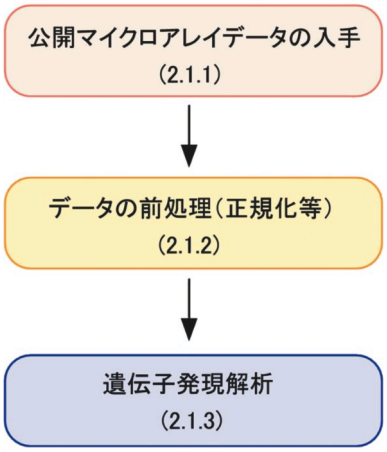




図 2：発現解析のフローチャート

ter, Gene. **344** (2005) P.33.
8）G. DalCorso, P. Pesaresi, S. Masiero, E. Aseeva, D. Schünemann, G. Finazzi, P. Joliot, R. Barbato, & D. Leister, Cell. **132** (2008) P.273.
9）M. Pellegrini, E. M. Marcotte, M. J. Thompson, D. Eisenberg, & T. O. Yeates, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **96** (1999) P.4285.
10）A. Takabayashi, N. Ishikawa, T. Obayashi, S. Ishida, J. Obokata, T. Endo, & F. Sato, Plant J. accepted (2008) doi: 10.1111/j.1365-313X.2008.03680.x
11）S. Ishihara, A. Takabayashi, K. Ido, T. Endo, K. Ifuku, & F. Sato, Plant Physiol. **145** (2007) P.668.
12）N. Ishikawa, A. Takabayashi, S. Ishida, Y. Hano, T. Endo, & F. Sato, Plant Cell Physiol. **49** (2008) P.1066.

# 3．光合成遺伝子の同定

横野　牧生[1)]，田中　亮一[1)]，田中　　歩[1)]

全ゲノム配列情報が利用できる生物種の数は急速に増加している．次世代シークエンサーの利用などにより，この数は今後ますます増加することが予想される．本章では，この情報を利用した遺伝子の同定法について紹介する．

## Identification of genes by using whole genome sequence

Makio Yokono, Ryouich Tanaka, Ayumi Tanaka

Recently, the number of available whole genome sequences is rapidly increasing. In order to identify the genes responsible for photosynthesis, we developed a bioinformatics tool, CCCT (Correlation Coefficient Calculation Tool), which calculates the correlation coefficient between the distributions of a certain phenotype and genes among a group of organisms. By using this method, we identified cyanobacterial DVR gene responsible for chlorophyll synthesis. This method can also be applied to the identification of non-photosynthetic genes.

### 3.1　はじめに

近年シーケンサーの高速化に伴い数多くの生物種の全ゲノムの配列情報が公開されている．一方でそこに含まれる遺伝子の機能についての情報（アノテーション）は不足しており，機能が不明とされているものが数多く存在する．遺伝子の機能を決定するために，関連する変異体を作成することやコードされているタンパク質を単離することが行われる．しかしこれらの作業には多くの時間がかかるため，どの遺伝子が目的とする表現型の発現に関与しているのかを予測することが必要とされる．

機能が不明な遺伝子の機能を予測するためによく用いられるのは相同性検索であり，BLAST や FASTA が有名である[1，2]．これを使うと，機能が既知のある遺伝子に類似した別の遺伝子を探すことができる．しかしながら単に機能が既知の遺伝子と類似のものを検索するだけでは，それらと相同性が無く機能が未知の遺伝子に対応できない．

未知の遺伝子の機能を推定する上で，その遺伝子がどのような生物種に存在しているかを知ることは大きな助けになる．言い換えると，ある生物群が特定の表現型を示している場合，その原因となる遺伝子（群）もそれらの生物全てに共通して存在する可能性が高い．本章では，この考えに基づいて筆者らが開発した CCCT（Correlation Coefficient Calculation Tool）による遺伝子の同定を紹介する．この手法は多くの生物種の全ゲノム情報を利用できることが前提となっているため，今後さらに精度は向上すると予想できる．

1）北海道大学低温科学研究所

### 3.2　解析対象にする生物群の選定

まず始めに未知の遺伝子を持っていることが確実な生物種をクエリー種として選定する．これは例えば，ある色素を蓄積するのにその合成に関与する遺伝子が未知であるような種である．次にクエリー種に近縁で，未知の遺伝子を持っていると予想される種と，持っていないと予想される種を解析対象に選ぶ．

この解析を行うためには準備段階として，解析対象にする生物群の持つ全遺伝子を総当たりで相同性検索を行うことが必要となる．筆者らはすでに NCBI において公開されている真核生物を含む約 850 種の生物の全遺伝子に対して総当たりで Blast 検索を完了しており，結果のファイルを統合データベースプロジェクトの協力を得て公開する予定である．しかしながら，非公開になっている生物種を用いる場合や，Blast 以外の相同性検索の結果を用いて CCCT を用いる場合のために，解析に用いる相同性一覧の表のフォーマットを示す［表 1］．一行目は解析対象にする生物の名前であり，左端がクエリー種で，順次ターゲット種を任意の順で並べる．二行目はそれぞれの生物が，目的とする未知の遺伝子を持つはず（－180）なのか，持たないはず（1）なのかを示す．ここでは検索方法に Blast を採用し相同性の指標としては E-value の指

**表 1**：相同性一覧の例

| *A. thaliana* | *A. thaliana* | *C. reinhardtii* | *E. coli* E22 | … |
|---|---|---|---|---|
| | −180 | 1 | −180 | … |
| NP_974945.2 | −180 | −15.04575749 | 0.146128036 | … |
| NP_974899.2 | −168 | −19.15490196 | 0.491361694 | … |
| NP_974897.2 | −17.52287875 | 0.698970004 | 0.146128036 | … |
| NP_974807.2 | −172 | −65 | 0.681241237 | … |
| … | … | … | … | … |

数部分を用いているので，値が小さいほど類似した遺伝子を持つことを表している．一列目の三行目以降はクエリー種（この場合は *Arabidopsis thaliana*）の全遺伝子それぞれのアクセッション番号を示す．二列目以降の三行目以降は，各列の生物種の全遺伝子をターゲットにして，クエリー種の各遺伝子の相同性を検索したときに最も相同性が高かった遺伝子の相同性の値である．例えば二列目の三行目は *A. thaliana* の遺伝子 NP_974945.2 をクエリーにして *A. thaliana* の全遺伝子を検索したときにベストヒットした遺伝子の相同性の値である．これは採用した相同性検索の方法で，各遺伝子と全く同じ遺伝子がヒットしたときに表示される相同性の値となる．また，三列目の三行目は *A. thaliana* の遺伝子 NP_974945.2 をクエリーにして *Chlamydomonas reinhardtii* の全遺伝子を検索したときにベストヒットした遺伝子の相同性の値である．

このように相同性の値を並べると，各行は各遺伝子の生物間の分布パターンを示すことになる．例えば三列目の NP_974945.2 は *C. reinhardtii* と *E. coli* には良く似ているものは無く，六行目の NP_974807.2 は *C. reinhardtii* には少し似ているものがあるが *E. coli* には似ているものが無いことがわかる．ここで理想とするパターン（二行目）と各行との相関をとれば，クエリーの持つ全遺伝子のうちどれが理想とする分布パターンに近いかがわかる．また各行のパターンをそれぞれ各行のパターンに対して相関をとれば，クエリーの持つ全遺伝子をその生物間分布パターンに基づいて自動的に分類することができる．筆者らは Mathematica を用いて Stand-alone Blast の制御，相同性一覧表の作成，および相関係数の算出を行ったが，統合データベースのホームページ上で FireFox にて動作する CCCT のスクリプトを公開予定である．

この解析で最も重要なのは，解析対象の生物種の選定と，理想とする分布パターンの設定である．未知の遺伝子を持つクエリー種に比較的近縁な種で，その遺伝子を持たないと予想される生物種が存在する場合や，クエリー種と遠い種でその遺伝子を持つと予想される種がある場合には，候補を絞り込みやすくなる．ここでは筆者らが特定に成功した光合成関連遺伝子を例にとり，その手順を示す．

## 3.3 クロロフィル合成に関する遺伝子

クロロフィルはその合成過程においてジビニル体からモノビニル体へ変換される．高等植物においてはその反応に関与する遺伝子（dvr）がすでに同定されているが [3]，他の多くの光合成生物にはその酵素が無くどのように変換しているのか不明であった．筆者らは CCCT を用いてシアノバクテリアの持つ dvr を特定することができた．

## 3.4 解析対象の生物種の選定

ほとんどのシアノバクテリアと紅藻は高等植物の持つ dvr を持たないにも関わらずモノビニル体のクロロフィルを光合成に用いている［表 2］．このことは新規の dvr があることを示している．モノビニル体のクロロフィルを持つ生物のうち高等植物と類似の dvr を持たない cyanobacteria および紅藻はすべて未知の dvr を持つと仮定した．これらの生物のうち *Synechocystis* sp. PCC 6803 は遺伝子操作が可能であり比較的良くアノテーションされていることから，これをクエリー種とし他の生物はターゲット種に加えた．一方でシアノバクテリアでも *Prochlorococcus* はジビニル体のクロロフィルを持ち，高等植物と類似の dvr も持たないことから，未知の dvr も持たないといえる．これらも全てターゲット種に加えた．高等植物，緑藻，珪藻は既知の dvr を持つため解析対象には加えなかった．

## 3.5 総当たりの相同性検索

*Synechocystis* sp. PCC 6803 の遺伝子は約 3600 個あ

表 2：解析対象の生物群と各生物の持つクロロフィルのタイプ

| | | |
|---|---|---|
| クロロフィルはモノビニル<br>高等植物の dvr は無い<br>未知の dvr を持つはず | *Synechocystis* sp. PCC 6803（クエリー種として使用） | |
| | *Anabaena variabilis* ATCC 29413 | *Crocosphaera watsonii* WH 8501 |
| | *Cyanothece* sp. CCY0110 | *Gloeobacter violaceus* PCC 7421 |
| | *Lyngbya* sp. PCC 8106 | *Nodularia spumigena* CCY9414 |
| | *Nostoc punctiforme* PCC 73102 | *Nostoc* sp. PCC 7120 |
| | *Synechococcus elongatus* PCC 6301 | *Synechococcus elongatus* PCC 7942 |
| | *Synechococcus* sp. JA-2-3B'a (2-13) | *Synechococcus* sp. JA-3-3Ab |
| | *Synechococcus* sp. RCC307 | *Synechococcus* sp. RS9916 |
| | *Synechococcus* sp. RS9917 | *Synechococcus* sp. WH 5701 |
| | *Synechococcus* sp. WH 7803 | *Synechococcus* sp. WH 7805 |
| | *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 | *Trichodesmium erythraeum* IMS101 |
| | *Cyanidioschyzon merolae* | |
| クロロフィルはジビニル<br>高等植物の dvr は無い<br>未知の dvr も無いはず | *Prochlorococcus marinus* str. AS9601 | *Prochlorococcus marinus* str. MIT 9211 |
| | *Prochlorococcus marinus* str. MIT 9301 | *Prochlorococcus marinus* str. MIT 9303 |
| | *Prochlorococcus marinus* str. MIT 9312 | *Prochlorococcus marinus* str. MIT 9313 |
| | *Prochlorococcus marinus* str. MIT 9515 | *Prochlorococcus marinus* str. NATL1A |
| | *Prochlorococcus marinus* str. NATL2A | *Prochlorococcus marinus* CCMP1375 |
| | *Prochlorococcus marinus* CCMP1986 | |
| クロロフィルはモノビニル<br>高等植物の dvr を持つ<br>未知の dvr を持つかは不明 | *Synechococcus* sp. BL107 | *Synechococcus* sp. CC9311 |
| | *Synechococcus* sp. CC9605 | *Synechococcus* sp. CC9902 |
| | *Synechococcus* sp. WH 8102 | *Arabidopsis thaliana* |
| | *Osterococcus tauri* | *Thalassiosira pseudonana* |

る．これらをひとつずつクエリー配列として，各ターゲット種の全遺伝子を対象に Blast サーチを行い，最も類似しているターゲット種の遺伝子を抜き出して表 1 のような類似度（期待値：E-value）の行列を作成した．ただしクエリー種は *Synechocystis* sp. PCC 6803 とし，ターゲット種は表 2 に赤および青で示した生物種を用いた．

## 3.6 相関係数による並べ替え

表 2 に示した条件をグラフに表した物が図 1 a）である．縦軸は E-value を対数表示にしたもので小さいほど相同性が高い遺伝子を持つことを意味する．このパターンとクエリー種の持つ全遺伝子それぞれの分布パターンとの相関をとり，相関の高い順にグラフとして表示した［図 1 b〜d］．最も相関が高かったのはシアノバクテリアのアンテナ（フィコビリソーム）をチラコイド膜に接続するリンカータンパク質であった．ほとんどのシアノバクテリアと紅藻はフィコビリソームをアンテナとして用いるが，*Prochlorococcus* はフィコビリソームを持たないことから，これは予期された結果である．次に相関係数が高かったのはアノテーションのない slr1923 であり，これは未知の dvr である可能性が高いと考えられた．他に相関が 90%以上の範囲でアノテーションがない遺伝子は slr1302 だけであった．この 2 つをクエリーにして NCBI の protein database に対して Blast 検索を行ったところ，slr1923 は *Methanococcus* の coenzyme F420 hydrogenase / dehydrogenase family protein と弱い相同性のあることがわかった．最後に *Synechocystis* sp. PCC 6803 で slr1923 を破壊した変異体がジビニル型のクロロフィルを蓄積したことから，slr1923 がシアノバクテリアでモノビニル型のクロロフィルの合成に関与していることが確認できた．

## 3.7 まとめ

本解析方法は単純な原理に基づいており，始めの相同性検索さえ終わらせてしまえば，相関による並び替えは数分で完了する．候補を絞り込めるかどうかは解析に用いる生物種の種類と数にかかっており，十分な生物種を用いることができれば候補を相当絞り込むことができる．実際シアノバクテリアの dvr では候補が 2 つに絞り込まれた．

一方で課題もいくつか存在する．ひとつは，目的の遺伝子の理想とする分布パターンを設定するには解析に用いる生物種の特徴をよく知っている必要がある点である．これについては生物の特徴を集めたデータベースの

ような物があればそれと連動させることである程度解決が可能である．もうひとつは，複数のタンパク質が共同で何かの反応に関わっている場合，それら全てが同じような生物間分布を示すとは限らないことである．この場合 CCCT では，異なる生物間で保存性が高いと思われる鍵となるタンパク質を見つけることはできるが，補う形で働くタンパク質すべてを検出することはできない可能性がある．補うタンパク質の分布パターンを複数想定し組み合わせて解くことは可能ではあるが，計算量がかなりのものになる．例えば鍵となるタンパク質は共通だが，補うタンパク質は生物によって 2 種類の組み合わせがある場合，クエリー種を 2 つ組み合わせることになるため，それぞれが 3000 の遺伝子を持っていた場合 3000×3000 通りの比較をすることになり，およそ丸一日計算にかかる．現時点では見つかった鍵となるタンパク質を手がかりに分子生物学的手法で相互作用するタンパク質を探すことがより容易かもしれない．なお，今回紹介したデータおよびツールは非営利目的に限り希望者に提供が可能である．

## 引用文献


1）W. R. Pearson, D. J. Lipman, Improved Tools for Biological Sequence Comparison, Proceedings of the National Academy of Sciences **85** (1988) 2444–2448.

2）S. F. Altschul, W. Gish, W. Miller, E. W. Myers, D. J. Lipman, Basic local alignment search tool (BLAST), J Mol Biol **215** (1990) 403–410.

3）N. Nagata, R. Tanaka, S. Satoh, A. Tanaka, Identification of a vinyl reductase gene for chlorophyll synthesis in Arabidopsis thaliana and implications for the evolution of Prochlorococcus species, Plant Cell **17** (2005) 233–240.

# 4．光合成生物のオミックスデータベース利用法

成川　　礼[1)]，岡本　　忍[2)]

近年のゲノム解析の進展と，それにともなうゲノムレベルの様々な網羅的解析手法の開発により，膨大な量の計測データがデータベースに蓄積され続けている．生物学者は研究を進める上で，これらの情報を有効に活用する必要性に迫られている．本章では，光合成生物に関連するオミックスデータベースの内容と所在について紹介する．

## Utilization of omics databases

Rei Narikawa, Shinobu Okamoto

Over the last decade, genomic and post-genomic data are accumulating at an ever-accelerating rate. Experimental biologists are on the verge of effectively utilizing these data to design experimental procedures. In this chapter, we introduce location and context of omics databases of phototrophic organisms.

### 4.1　ゲノム配列データベース

ゲノムの塩基配列データは，実際に配列決定を行った研究機関が国際塩基配列データベース（International Nucleotide Sequence Databases）に登録することにより，世界中に公開され利用可能になる．国際塩基配列データベースとは，日本のDDBJ（DNA Data Bank of Japan，表1-1），米国NCBI（National Center for Biotechnology Information，表1-2），および欧州EBI（European Bioinformatics Institute，表1-3）からなる組織であり，世界中の塩基配列データ登録の窓口になっている．登録された塩基配列データは，国際規約に従いアクセッション番号（Accession number）が付与される．ひとつの機関に登録された配列データは，公開と同時に同一のアクセッション番号でDDBJ，GenBank，EMBLの三者間で共有される．配列決定が完了した生物種に関しては，DDBJのGene Trek in Procaryote Space（GTPS，表1-4）やGenBankのRefSeq[1)]（表1-5）のように独自の判断基準と自動処理を用いて，均一な遺伝子構造抽出を行ったゲノム情報なども公開されている．また，Joint Genome Institute（JGI，表1-6）やJ. Craig Venter Institute（JCVI，表1-7）など，配列機関やプロジェクトによっては，ゲノム配列決定完了前のドラフト状態での公開もおこなわれている．

配列決定のコストが下がり，膨大な数のゲノムプロジェクトが精力的に行われた結果，研究者は自分に関係のある生物種のゲノムプロジェクトの把握すら困難な状況にある．このような状況を受け，プロジェクト単位，生物種単位で配列決定プロジェクトの進捗状況やプロジェクトの推進機関などメタデータの重要性が高まっている．Genome Online Database[2)]（GOLD，表1-8）は，プロジェクト毎の進捗状況に応じて，解読が完全に終了した生物のゲノムプロジェクト，真核生物，古細菌，真正細菌の現在進行形のゲノムプロジェクト，メタゲノムプロジェクトという視点で分類，整理され閲覧可能である．このデータベースは，JGIの微生物ゲノムプロジェクトのチームリーダーであるNikos Kyrpidesを中心としてボランティアベースで提供されている．また，NCBI Genome Project（表1-9）は，NCBIの豊富なゲノム情報リソースをゲノムプロジェクト単位で整理し直すことで，ゲノム配列情報，生物種情報やプロジェクトに関連する主要機関などの情報を参照可能である．

### 4.2　個別生物種の統合データベース

網羅的解析時代以前は，個別の研究プロジェクトデータベースが，それぞれの関係者により開発，維持されてきた．網羅解析時代になると，そのようなデータベースが乱立し，利用者が必要な情報にたどり着くことが困難になった．また，技術や資金の問題から，プロジェクト毎でのデータベースの維持管理も難しくなっている．このような背景から，近年，データベースを統合して利便

1）東京大学大学院総合文化研究科広域科学専攻
2）かずさDNA研究所

表 1：ゲノム配列・ゲノムプロジェクトデータベース

| No | データベース名 | URL |
|---|---|---|
| 1 | DDBJ | http://www.ddbj.nig.ac.jp/index-e.html |
| 2 | NCBI | http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ |
| 3 | EBI | http://www.ebi.ac.uk/ |
| 4 | GTPS | http://gtps.ddbj.nig.ac.jp/ |
| 5 | RefSeq | http://www.ncbi.nlm.nih.gov/RefSeq/ |
| 6 | JGI | http://www.jgi.doe.gov/ |
| 7 | JCVI | http://www.jcvi.org/ |
| 8 | GOLD | http://www.genomesonline.org/ |
| 9 | NCBI Genome Project | http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db＝genomeprj |
| 10 | ELIXIR | http://www.elixir-europe.org/ |

性を上げようという試みが加速している．各研究機関や研究者コミュニティは，分散している大量なゲノム情報を収集整理して検索機能，比較機能などをつけることにより利用者の便宜をはかり，情報の付加価値を高めようとしている．このような試みは，米国 NCBI や英国 ELIXER（表 1-10）など，ライフサイエンスの包括的なデータベース統合だけでなく，光合成のモデル生物毎にも精力的に行われている．ここでは光合成に関連する生物の統合データベースの一部を紹介する．

## 4.3 シアノバクテリア，光合成細菌データベース

シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 は，酸素発生型光合成生物として 1996 年に世界で初めてゲノム配列が決定された[3]．CyanoBase[4]（表 2-1）は，当初 *Synechocystis* のゲノムデータベースとして開発され，その後，現在 30 種以上のシアノバクテリアと光合成細菌のゲノム情報が収集公開されている．

CyanoBase では，遺伝子構造，遺伝子産物情報，ゲノムマップなどの他に，プロテオーム解析の結果[5]，Yeast two-hybrid 法によるタンパク質相互作用実験情報[6]や，外部データベースへの豊富なリンクも提供している．また，1998 年には変異株の情報を共有したいという利用者の要望にこたえて CyanoBase 内に変異株データベース CyanoMutants が，さらに，その機能を拡張するかたちで研究者自身の遺伝子注釈を自然言語で記入することが出来る CyanoGenes が提供された．2002 年には京都大学のバイオインフォマティクスセンターからコミュニティ型アノテーションの先駆けとなる CYORF（表 2-2）が提供され，専門家によるジャンボリー形式の遺伝子注釈が試みられ，文献証拠に基づいた遺伝子注釈が提供されている．また，アメリカの Elhai らによって，CyanoBIKE（表 2-4）と呼ばれるコミュニティデータベースも近年開発され，Web 上から様々なコマンドを使用したバイオインフォマティクス解析が可能となっている．2007 年には，Web ページに注釈付けが行えるシステム，KazusaAnnotation（表 2-3）を用い，*S*.PCC 6803 の約 1200 報の原著論文全文中に記述された遺伝子・タンパク質名を抽出する試みがなされている．それ以外にも，東京大学の園池らは網羅的に遺伝子破壊株のクロロフィル蛍光を測定し，そのプロファイルによる機能分類を行ったデータベース，Fluorome[7]（表 2-5）を公開している．

## 4.4 シロイヌナズナデータベース

世界における主なシロイヌナズナデータベースを表 3

表 2：シアノバクテリア，光合成細菌データベース

| No | データベース名 | URL |
|---|---|---|
| 1 | CyanoBase | http://bacteria.kazusa.or.jp/cyanobase |
| 4 | CYORF | http://cyano.genome.jp/ |
| 3 | KazusaAnnotation | http://a.kazusa.or.jp/ |
| 4 | CyanoBIKE | http://cyanobike-community.csbc.vcu.edu/welcome-frame.php |
| 5 | Fluorome | http://sunlight.k.u-tokyo.ac.jp/fluorome/about.php |

表3：シロイヌナズナ関連データベース

| No | データベース名 | URL |
|---|---|---|
| 1 | TAIR | http://www.arabidopsis.org |
| 2 | AGNS | http://wwwmgs.bionet.nsc.ru/agns |
| 3 | AGRIS | http://arabidopsis.med.ohio-state.edu |
| 4 | AMPdb | http://www.plantenergy.uwa.edu.au/applications/ampdb/index.html |
| 5 | MPSS | http://mpss.udel.edu/at/ |
| 6 | AtNoPDB | http://bioinfo.scri.sari.ac.uk/cgi-bin/atnopdb/proteome_comparison |
| 7 | ARAMEMNON | http://aramemnon.botanik.uni-koeln.de |
| 8 | ARTDEdb | http://omicspace.riken.jp/ARTADE |
| 9 | ASRP | http://cgrb.orst.edu/smallRNA/db |
| 10 | AtGDB | http://www.plantgdb.org/AtGDB |
| 11 | AthaMap | http://www.athamap.de |
| 12 | ATTED-II | http://www.atted.bio.titech.ac.jp |
| 13 | CATMA | http://www.catma.org |
| 14 | DATF | http://datf.cbi.pku.edu.cn |
| 15 | GABI-Ka | http://www.GABI-Kat.de |
| 16 | MAtDB | http://mips.gsf.de/proj/thal/db |
| 17 | NASCarrays | http://affymetrix.arabidopsis.info |
| 18 | PlantQTL-GE | http://www.scbit.org/qtl2gene/new |
| 19 | Plprot | http://www.pb.ipw.biol.ethz.ch/proteomics |
| 20 | RARGE | http://rarge.gsc.riken.jp |
| 21 | SeedGenes | http://www.seedgenes.org |
| 22 | SUBA | http://www.suba.bcs.uwa.edu.au |
| 23 | WAtDB | http://www.watdb.nl |
| 24 | GeneFarm | http://urgi.versailles.inra.fr/Genefarm |
| 25 | TIGR Arabidopsis annotation db | http://www.tigr.org/tdb/e2k1/ath1/ath1.shtml |

にまとめた．なかでも圧倒的に整備されているのが，The Arabidopsis Information Resource[8]（TAIR，表3-1）である．TAIRは，シロイヌナズナ（*Arabidopsis thaliana*）の包括的なデータベースであり，30以上の研究機関による遺伝子構造，遺伝子産物情報，代謝，遺伝子発現の他に，ゲノムマップ，遺伝子マーカー，文献情報とシロイヌナズナ研究コミュニティに関する情報などを統合して提供している．2008年時点で，月間3万人以上の利用者がある．また，TAIRはThe Gene Ontology Consortium[9]でも中心的な役割を果たしており，GO termの整備やGOに基づいた遺伝子注釈が精力的に行われている．遺伝子構造予測と遺伝子注釈は，年に1～2回の頻度で更新されており，最新のTAIR8（2008年4月リリース版）では，27,235の推定タンパク質を含む38,963の遺伝子モデルを提供している．さらにTAIRは，そのWebページから他のシロイヌナズナ資源まで広範囲なリンクを提供し，ポータルサイトの役目も果たしている．

The TIGR Arabidopsis thaliana Genome Annotation Database[10]（表3-25）に含まれる配列は，TIGRを含む全てのArabidopsis Genome Initiative（AGI）に所属する研究機関に由来するものである．このデータベースはこれらのデータの標準化のため，解析とアノテーションを行ったものである．本データベースは，TAIR，MIPS（表6-1），GO，INTERPRO（表6-2），PRINTS（表6-3），PRODOM（表6-4），PROSITE（表6-5），Pfam（表6-6）などの情報が付加されている．また検索ツールが3種類，解析ツールが2種類，利用できる．

MAtDB[11]（MIPS Arabidopsis thaliana Database，表3-16）は，AGIの一部としてEuropean Scientists Sequencing Arabidopsis（ESSA）計画のゲノム配列データのリポジトリとして開始された．現在は，分散しているデータの統合と各種解析・可視化ツールの提供により，生物学的知識の統合リソースとなっている．また，各プロジェクトによる全長cDNAのID統合データベースを持ち，AGI Locusコードを軸にTIGR，TAIRと相互

参照が可能になっている．他の植物ゲノムとの比較ゲノム解析ツールも充実しており，シンテニーブラウザーSynBrowse[12]により，ミヤコグサ，タルウマゴヤシ，トウモロコシ，イネなどとゲノムレベルで比較することができる．

ATTED-II[13]（表3-12）は，公開されているシロイヌナズナのマイクロアレイデータ，58実験，1,388スライドと予測cis-elementから推測された遺伝子の共発現解析に基づいた相互制御関係のデータを提供している．また，遺伝子発現プロファイルを可視化するツール，LabATTEDや，検索ツールなども提供している．データベースの更新状況や，データ数などの統計情報など，解析を支援する周辺情報も充実している．

## 4.5 イネゲノム解析プロジェクトとイネデータベース

世界的に主要なイネ関連データベースを表4にまとめた．IRGSP（The International Rice Genome Sequence

**表4**：イネ科植物データベース

| No | データベース名 | URL |
|---|---|---|
| 1 | RAP-DB | http://rapdb.lab.nig.ac.jp/ |
| 2 | TIGR Rice Genome Annotation | http://www.tigr.org/tdb/e2k1/osa1/ |
| 3 | INE | http://rgp.dna.affrc.go.jp/giot/INE.html |
| 4 | Oryzabase | http://www.shigen.nig.ac.jp/rice/oryzabase/top/top.jsp |
| 5 | Gramene | http://www.gramene.org/Oryza_sativa/index.html |
| 6 | Rice MPSS | http://mpss.udel.edu/rice/ |
| 7 | RiceGE（Rice Functional Genomics Database） | http://signal.salk.edu/cgi-bin/RiceGE |
| 8 | RAD（Rice Annotation Database） | http://rad.dna.affrc.go.jp/index_j.html |
| 9 | KOME（Knowledge-based Oryza Molecular biological Encyclopedia） | http://cdna01.dna.affrc.go.jp/cDNA/ |
| 10 | RiceGAAS | http://ricegaas.dna.affrc.go.jp/ |
| 11 | MOsDB（MIPS Oryza sativa Database） | http://mips.gsf.de/proj/plant/jsf/rice/index.jsp |
| 12 | MGOS（Magnaporthe Grisea Oryza Sativa Database） | http://www.mgosdb.org/ |
| 13 | OsGDB | http://www.plantgdb.org/OsGDB/index.php |
| 14 | RetrOryza | http://www.retroryza.org/ |
| 15 | RED（The Rice Expression Database） | http://red.dna.affrc.go.jp/RED/ |
| 16 | Rice Proteome Database | http://gene64.dna.affrc.go.jp/RPD/main_en.html |
| 17 | DRTF（The Database of Rice Transcription Factor） | http://drtf.cbi.pku.edu.cn/ |
| 18 | TIGR Oryza Repeat Database | http://www.tigr.org/tdb/e2k1/osa1/blastsearch.shtml |
| 19 | GTOP（Genomes TO Protein structures and functions） | http://structure.rice.dna.affrc.go.jp/gtop/gtop.html |
| 20 | RKD（Rice Kinase Database） | http://rkd.ucdavis.edu/index.htm |
| 21 | The Genome Cluster Database（GCD） | http://bioweb.ucr.edu/databaseWeb/index.jsp |
| 22 | CSRDB | http://sundarlab.ucdavis.edu/smrnas/ |
| 23 | RiceTFDB（Rice Transcription Factor DataBase） | http://ricetfdb.bio.uni-potsdam.de/v2.1/ |
| 24 | BarleyBase | http://www.plexdb.org/plex.php?database＝Rice |
| 25 | ASIP（Alternative Splicing In plant） | http://www.plantgdb.org/ASIP/ |
| 26 | IRGSP（The International Rice Genome Sequencing Project） | http://rgp.dna.affrc.go.jp/J/IRGSP/index.html |
| 27 | RMG（Rice Mitochondrial Genome Information） | http://rmg.rice.dna.affrc.go.jp/ |
| 28 | RPSD（Rice Protein Structure Database） | http://structure.rice.dna.affrc.go.jp/ |
| 29 | ricemarker | http://shenghuan.shnu.edu.cn/genefunction/ricemarker.htm |
| 30 | Rice Pipeline | http://cdna01.dna.affrc.go.jp/PIPE/index_ja.html |
| 31 | PLACE | http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/ |
| 32 | Rice SNPs Database | http://www.pgcdna.co.jp/snps/index.html |
| 33 | Rice Research Database（RRDB） | http://www.pgcdna.co.jp/igs_system/index.html |
| 34 | Wild Rice Database（WLD） | http://www.pgcdna.co.jp/cgi-bin/wrdb/content.cgi |
| 35 | Oryza Tag Line | http://urgi.versailles.inra.fr/OryzaTagLine/ |
| 36 | IRIS - International Rice Information System | http://www.iris.irri.org |
| 37 | POGs/PlantRBP | http://plantrbp.uoregon.edu/ |

Project，表 4-26）は，日本を含む 10 カ国からなる国際イネゲノム塩基配列解析プロジェクトで決定したイネ（*Oryza sativa* L. ssp. Japonica）ゲノムデータを公開している．イネの 12 本の染色体，合計約 4 億塩基対に対して，階層型ショットガン方式により，PAC，BAC クローンをシーケンスし，DNA マーカーに基づき再配置が行われている．現在の最新版は Build 5.0（2008 年 12 月リリース版）である．

RAP-DB[14]（Rice Annotation Project Database，表 4-1）は，独立行政法人農業生物資源研究所（NIAS），独立行政法人産業技術総合研究所（CBRC），大学共同利用機関法人　情報・システム研究機構　国立遺伝学研究所（NIG）がイネゲノム全塩基配列上に存在する 29,550 の予測遺伝子の位置を決定し，Gene Ontology，EST 配列，タンパク質機能ドメイン（InterPro），TIGR Annotation Pseudomolecules などの情報を付与したアノテーションデータベースである．特に専門家による遺伝子のマニュアルキュレーションに注力しており，ジャンボリー形式の遺伝子アノテーションが過去 4 回行われ，成果が RAP4（2007 年 10 月）として反映されている．

TIGR Rice Genome Annotation Resource（表 4-2）は，The Institute for Genomic Research（TIGR，現 JCVI）が，予測遺伝子 42,653 個の位置を決定し，機能アノテーションの付与，発現データ，完全長 cDNA データ，MPSS データ，SAGE データ，Genbank EST をマッピングしたプローブ，Agilent 社や Affymetrix 社の Rice Genome Array プローブ情報などを統合したアノテーションデータベースである．このプロジェクトでは，コンピューター解析と人手によるキュレーション作業により，高精度のゲノム注釈を行うことを目的としている．リリース 4 の段階で，42,653 の遺伝子（トランスポゾン関連遺伝子を除く）を同定した．

Gramene[15]（表 4-5）データベースは，イネ科植物に関する包括的なゲノム情報を収集したデータベースである．ヒトやマウスゲノムプロジェクトデータベースに携わってきた Cold Spring Harbor 研究所の Lincoln Stein が開発している．イネ科植物の基本的なゲノム情報以外にも，文献情報によるタンパク質の機能構造注釈，代謝マップおよび EST 配列や QTL などの情報が検索可能である．また，比較ゲノムツール CMap を用いて，イネ，ムギ，トウモロコシ，アワ，シロイヌナズナなどの種間でシンテニー領域を比較することできる．ゲノムブラウザーには，多くの真核生物ゲノムプロジェクトで標準的な Ensembl Genome Browser を使用しており，EST 配列，発現データ，SNPs 情報などの膨大なデータがゲノム上にマッピングされている．また Web ベースのデータマネジメントシステムである BioMart[16]（表 6-7）を用いて，共通プロモーター領域や共通の機能ドメインをもつ任意のゲノム配列といったデータを一括取得することが可能となっている．

## 4.6　その他のオミックスデータベース

EST データベース：かずさ DNA 研究所では，クラミドモナス，ミヤコグサ，シロイヌナズナ，スサビノリ，トマトの EST データ（表 5-1）が公開されている．様々な真核生物の EST を集めている TBestDB（表 5-2）というデータベースも存在する．真核藻類のデータ取得等に便利である．

トランスクリプトームデータベース：広範囲の生物のトランスクリプトームデータのポータルサイトとしては，ArrayExpress（表 5-3）や GEO DataSets（表 5-4）などが存在する．シロイヌナズナの発現データはかなり蓄積されている．前者のデータベースにはシアノバクテリアのデータは少ないが，後者のデータベースには 24 つのデータセットが蓄積されている．GEO DataSets には近年プロテオームデータも蓄積している．シアノバクテリアに関しては，KEGG EXPRESSION（表 5-5）にもデータが蓄積されている．

**表 5**：その他のオミックスデータベース

| No | データベース名 | URL |
|---|---|---|
| 1 | Kazusa Plant cDNA project | http://www.kazusa.or.jp/e/resources/database.html |
| 2 | TBestDB | http://tbestdb.bcm.umontreal.ca/searches/welcome.php |
| 3 | ArrayExpress | http://www.ebi.ac.uk/microarray-as/ae/ |
| 4 | GEO DataSets | http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db＝gds&cmd＝search&term |
| 5 | KEGG EXPRESSION | http://www.genome.jp/kegg-bin/get_htext?htext＝Exp_DB&hier＝1 |
| 6 | NSF2010 Metabolomics | http://lab.bcb.iastate.edu/projects/plantmetabolomics/ |

メタボロームデータベース：メタボローム解析に関しては近年データが蓄積し始めているので，データベースとして公開されている例が少ない．NSF2010 Metabolomics（表5-6）にシロイヌナズナのメタボローム解析データが集められている．

## 参考文献


1）K. D. Pruitt, T. Tatusova, & D. R. Maglott, Nucleic Acids Res. **35** (2007) D.61.
2）K. Liolios, K. Mavromatis, N. Tavernarakis, & N. C. Kyrpides, Nucleic Acids Res. **36** (2008) D.475.
3）T. Kaneko, S. Sato, H. Kotani, A. Tanaka, E. Asamizu, Y. Nakamura, N. Miyajima, M. Hirosawa, M. Sugiura, S. Sasamoto, T. Kimura, T. Hosouchi, A. Matsuno, A. Muraki, N. Nakazaki, K. Naruo, S. Okumura, S. Shimpo, C. Takeuchi, T. Wada, A. Watanabe, M. Yamada, M. Yasuda, & S. Tabata, DNA Res. **3** (1996) P. 109.
4）Y. Nakamura, T. Kaneko, & S. Tabata, Nucleic Acids Res. **28** (2000) P.72.
5）T. Sazuka, M. Yamaguchi, & O. Ohara, Electrophoresis. **20** (1999) P.2160.
6）S. Sato, Y. Shimoda, A. Muraki, M. Kohara, Y. Nakamura, & S. Tabata, DNA Res. **14** (2007) P.207.
7）H. Ozaki, M. Ikeuchi, T. Ogawa, H. Fukuzawa, & K. Sonoike, Plant Cell Physiol. **48** (2007) P.451.
8）D. Swarbreck, C. Wilks, P. Lamesch, T. Z. Berardini, M. Garcia-Hernandez, H. Foerster, D. Li, T. Meyer, R. Muller, L. Ploetz, A. Radenbaugh, S. Singh, V. Swing, C. Tissier, P. Zhang, & E. Huala, Nucleic Acids Res. **36** (2008) D.1009.
9）Nucleic Acids Res. **36** (2008) D.440.
10）A. P. Chan, P. D. Rabinowicz, J. Quackenbush, C. R. Buell, & C. D. Town, Methods Mol. Biol. **406** (2007) P. 113.
11）H. Schoof, R. Ernst, V. Nazarov, L. Pfeifer, H. W. Mewes, & K. F. Mayer, Nucleic Acids Res. **32** (2004) D. 373.
12）X. Pan, L. Stein, & V. Brendel, Bioinformatics. **21** (2005) P.3461.
13）T. Obayashi, K. Kinoshita, K. Nakai, M. Shibaoka, S. Hayashi, M. Saeki, D. Shibata, K. Saito, H. Ohta, Nucleic Acids Res. **35** (2007) D.863.
14）Rice Annotation Project, T. Tanaka, B. A. Antonio, S. Kikuchi, T. Matsumoto, Y. Nagamura, H. Numa, H. Sakai, J. Wu, T. Itoh, T. Sasaki, R. Aono, Y. Fujii, T. Habara, E. Harada, M. Kanno, Y. Kawahara, H. Kawashima, H. Kubooka, A. Matsuya, H. Nakaoka, N. Saichi, R. Sanbonmatsu, Y. Sato, Y. Shinso, M. Suzuki, J. Takeda, M. Tanino, F. Todokoro, K. Yamaguchi, N. Yamamoto, C. Yamasaki, T. Imanishi, T. Okido, M. Tada, K. Ikeo, Y. Tateno, T. Gojobori, Y. C. Lin, F. J. Wei, Y. I. Hsing, Q. Zhao, B. Han, M. R. Kramer, R. W. McCombie, D. Lonsdale, C. C. O'Donovan, E. J. Whitfield, R. Apweiler, K. O. Koyanagi, J. P. Khurana, S. Raghuvanshi, N. K. Singh, A. K. Tyagi, G. Haberer, M. Fujisawa, S. Hosokawa, Y. Ito, H. Ikawa, M. Shibata, M. Yamamoto, R. M. Bruskiewic, D. R. Hoen, T. E. Bureau, N. Namiki, H. Ohyanagi, Y. Sakai, S. Nobushima, K. Sakata, R. A. Barrero, Y. Sato, A. Souvorov, B. Smith-White, T. Tatusova, S. An, G. An, S. OOta, G. Fuks, G. Fuks, J. Messing, K. R. Christie, D. Lieberherr, H. Kim, A. Zuccolo, R. A. Wing, K. Nobuta, P. J. Green, C. Lu, B. C. Meyers, C. Chaparro, B. Piegu, O. Panaud, & M. Echeverria, Nucleic Acids Res. **36** (2008) D.1028.
15）P. Jaiswal, J. Ni, I. Yap, D, Ware, W. Spooner, K. Youens-Clark, L. Ren, C. Liang, W. Zhao, K. Ratnapu, B. Faga, P. Canaran, M. Fogleman, C. Hebbard, S. Avraham, S. Schmidt, T. M. Casstevens, E. S. Buckler, L. Stein, & S. McCouche, Nucleic Acids Res. **34** (2006) D. 717.
16）S. Durinck, Y. Moreau, A. Kasprzyk, S. Davis, B. De Moor, A. Brazma, & W. Huber, Bioinformatics. **21** (2005) P.3439.


**表6**：Webアプリケーション

| No | アプリケーション名 | URL |
|---|---|---|
| 1 | MIPS | http://mips.gsf.de/ |
| 2 | INTERPRO | http://www.ebi.ac.uk/interpro/ |
| 3 | PRINTS | http://www.bioinf.manchester.ac.uk/dbbrowser/PRINTS/index.php |
| 4 | PRODOM | http://prodom.prabi.fr/prodom/current/html/home.php |
| 5 | PROSITE | http://ca.expasy.org/prosite/ |
| 6 | Pfam | http://pfam.sanger.ac.uk/ |
| 7 | BioMart | http://www.biomart.org/ |

■紀要「低温科学」の変遷

・低温科學，第 1 輯（1944 年）－第 10 輯（1953 年）
・低温科學．生物篇，第 11 輯（1954 年）－第 35 輯（1978 年）
・低温科学．物理篇，第 11 輯（1953 年）－第 53 輯（1995 年）
・低温科学．物理篇．資料集，第 27 輯（1970 年）－第 63 輯（2005 年）
（このうち，第 1 輯（1944 年 12 月）～第 3 輯（1950 年 12 月）は岩波書店発行，第 4 輯（1948 年 10 月）は北方出版社発行，第 5 輯（1950 年 12 月）以降は低温科学研究所発行）
・低温科学．第 64 巻（2005 年）～

■著作権

・本紀要に掲載された論文の著作権は，北海道大学低温科学研究所に属する．
・ただし，原著者が出典を明示して再利用することは妨げない．
・また，掲載論文の一部または全部を電子的に蓄積し，北海道大学低温科学研究所が行う情報提供サービスにより公開することがある．

2009 年 3 月 31 日

発　行　者　北海道大学　低温科学研究所
〒060-0819　札幌市北区北 19 条西 8 丁目
URL：http://www.lowtem.hokudai.ac.jp

印刷・製本　㈱アイワード

© 2009 Institute of Low Temperature Science, Hokkaido University