

# 光合成研究

第19巻 第1号 (通巻54号) 2009年4月

**NEWS LETTER Vol. 19 NO. 1 April 2009**  
THE JAPANESE ASSOCIATION FOR PHOTOSYNTHESIS RESEARCH

---

巻頭言	池内昌彦	1
第9回日本光合成研究会公開シンポジウム		
	植物の多様性を支える多様な側面	2
トピックス 青色光受容体フォトトロピンに依存した植物の生長制御		
	井上晋一郎、武宮淳史、島崎研一郎	4
トピックス 光合成膜ガラクト脂質合成経路の多様性		
	栗井光一郎	9
解説 光化学系複合体の結晶解析の歴史とタンパク質結晶解析の初歩		
	池内昌彦	13
解説 光化学系IIの例から見る膜タンパク質複合体の結晶化と構造解析		
	沈 建仁・川上 恵典	19
解説 不安定なタンパク質を見る		
	福山恵一	26
解説 タンパク質相互作用を見る		
	栗栖源嗣	31
集会案内 学術創成研究合同シンポジウムのご案内		
	光合成の色素系と反応中心に関するセミナーXVII 開催予告	35
新刊図書		36
	「光合成研究法」出版のご案内	37
事務局からのお知らせ		40
日本光合成研究会会員入会申込書		41
日本光合成研究会会則		42
幹事会名簿		44
編集後記		45
賛助法人会員広告		



## 巻頭言

ご挨拶

2009年より、2年間、日本光合成研究会の代表をお引き受けすることになりました。つきましては、簡単な挨拶を述べさせていただきます。

日本光合成研究会は1979年に発足して以来、ちょうど30年になりました。その間、日本を含めて光合成研究は順調に発展を続けてきて、日本光合成研究会の活動もその一翼を担ってきたと思います。また、昨今はエネルギー・食糧問題、地球温暖化問題、また経済活動の世界的な失速などさまざまな問題に直面しており、社会から光合成研究への期待はますます大きくなっています。また、光合成研究が植物科学やバイオテクノロジーにより広く組み込まれることによって、より広い分野の人たちに受け入れられつつあります。このような時代には、日本光合成研究会の役目は自ずから変わらざるを得ないかもしれません。現在、ちょうど「研究会」から「学会」への移行の是非を議論していますが、その結論はともかくとして、私たちはより開かれた研究会として、他分野や社会との連携をはかりつつ活動を進めていく必要があります。また、若い人にとっては、光合成研究と他の分野との研究での境界があいまいになってきています。光合成研究はいうまでもなく総合科学です。人工光合成から生物物理学、生化学、分子生物学、細胞学、生理学、生態学、地球環境科学まで多岐にわたっています。これらの研究と研究者の情報交換と切磋琢磨を目指すことはいうまでもありません。日本光合成研究会はこれらの問題に積極的に取り組み、光合成研究のますますの発展を目指します。

このような時期に、代表を引き受けた小身としましては、その責務に耐えられないのではないかと皆様への不安を払拭すべく、会の運営と発展に力を尽くして行きたいと考えています。当面は、事務局・鹿内さんと多くの常任幹事の方々と協力して運営していく方針です。また、そのためには会員の皆様にもご尽力をお願いすることも多々あるかと思えます。どうぞよろしくお願いいたします。

池内昌彦

第9回日本光合成研究会公開シンポジウム  
**植物の生産性を支える多様な側面**

2009年5月29日～30日（東京大学数理科学研究棟大講義室（駒場キャンパスI））

プログラム（敬称略）

**5月29日（金）**

- 13:00           はじめに
- 13:10~13:50    芦刈基行（名大）「イネの多様性研究から育種へ」
- 13:50~14:10    石田宏幸（東北大）「暗処理葉における葉緑体のオートファジー」
- 14:10~14:25    Chosen from poster presenters
- ポスター紹介、ブレイク&ポスターViewing
- 16:30~17:20    総会
- 17:20~18:00    牧野周（東北大）「イネの個葉光合成と生産性」
- 18:00~          総合討論（1）
- 18:20~          懇親会

**5月30日（土曜日）**

- 8:30~           ポスター賞発表&授賞式
- 9:00~9:40      小川健一（岡山生物研）「グルタチオンによるCO<sub>2</sub>固定回路の制御と収量性」
- 9:40~10:20     井澤毅（生物研）「イネの収量性における出穂期制御や概日時計の役割」
- ブレイク
- 10:35~11:15    野口航（東大）「植物の呼吸と物質生産」
- 11:15~11:35    坂本光（九大）「植物の塩ストレス耐性に関与するアンキリンリピートタンパク質ITN1」
- 11:35~11:50    Chosen from poster presenters
- 11:50~          総合討論（2）
- 12:30~13:00    ポスター撤去
- 閉会

オーガナイザー：小川 健一（岡山生物研）、牧野 周（東北大）

例年通り、優秀ポスター賞を互選します。沢山のポスター発表申し込みをお待ちしています。またポスター発表の中で希望する方の中から、オーガナイザーが2題を選び、口頭発表（15分）を行っていただく予定です。

参加ご希望の方は、電子メール（[photosymposia@bio.c.u-tokyo.ac.jp](mailto:photosymposia@bio.c.u-tokyo.ac.jp)）でご登録をお願いします。シンポジウムは誰でも参加できます。整理の都合上、事前登録締切りは5月16日ですが、当日参加も受け付けます。ポスター発表は、事前登録のみとし、会員に限らせていただきます。（発表を希望される方はご入会ください。シンポジウム当日ご入会いただくことも可能です）。

近日中にWeb上（<http://wwwsoc.nii.ac.jp/photosyn/index.html>）でも詳細をお知らせ致します。

#### 電子メールでの登録内容

氏名：	
所属：	
連絡先（住所、電話/FAX、E-mail）：	
懇親会参加希望（一般 3,000円、学生 2,000円の予定）：	有 無
ポスター発表：	有 無
ポスター発表を行う場合の口頭発表希望：	有 無
ポスタータイトル：	
発表者氏名・所属：	
内容（2～3行程度）：	

## 青色光受容体フォトトロピンに依存した植物の生長制御

九州大学・理学研究院

井上晋一郎、武宮淳史、島崎研一郎

## はじめに

植物は太陽光を光合成に必要なエネルギー源として利用するのみならず、光の質と量の違いを環境情報として利用することにより、刻々と変化する光環境下において生長が最適となるよう応答する。光を感知する受容体には、フィトクロム、クリプトクロム、フォトトロピン等がある。このうち、フィトクロムは主に赤色光と遠赤色光を、クリプトクロムは青色光を受容し、多様な光形態形成反応に関与する。これに対し、青色光を受容するフォトトロピンは光屈性、葉緑体の光定位運動、気孔の開口、葉の平坦化、葉の光定位運動などを誘導する。フォトトロピンが制御するこれらの応答は、植物が光を出来るだけ多く吸収し、光合成を増大させる働きを持つ。本稿では、フォトトロピンが青色光をシグナルとして利用し、植物の生長を促進する機構について概説する。また、最近明らかになりつつあるフォトトロピン自身の活性制御についてもふれる。

## 1. フォトトロピンに依存した植物の生長促進

フォトトロピン(*phot1*、*phot2*)は植物特有の青色光受容体で、青色光に依存して上記の生理反応を誘導する(図1)<sup>1-3)</sup>。光屈性、葉の光定位運動(個々の葉が、青色光に対し垂直に葉面を向ける運動)は、植物体が光の方向に向かって成長・運動し、葉面を光に垂直に向ける反応である。葉緑体光定位運動は、弱い光のもとでは葉緑体が光と垂直な細胞面に集まり、強い光のもとでは葉緑体が光と平行な細胞面に逃げる反応である。気孔開口は、大気と植物体内とのガス交換に用いられる表皮の穴「気孔」を開かせる反応である。葉の平坦化とは、葉が巻くのを防ぎ、平らにする反応である。これらの反応は、植物が光合成に必要な光を効率よく集め、炭酸固定に用いる二酸化炭素をより多

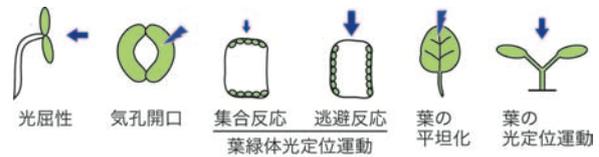


図1 フォトトロピンが制御するシロイヌナズナの青色光反応

図中の青い矢印は、方向性のある青色光を示し、その大小で青色光強度を表している。青い稲妻は、方向性のない青色光を示す。

く取り込むための応答であると考えられてきた。しかしながら、実際にフォトトロピンを介した反応が植物の光合成を向上させるかどうかの直接的証拠は得られていなかった。我々はフォトトロピン変異株を用い、フォトトロピンが実際に光合成を増大させ、植物の生長を促進することを実験的に示した<sup>4)</sup>。

シロイヌナズナの野生株を  $25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  の赤色光下と、同じ強さの赤色光に  $0.1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  の微弱な青色光を添加した混合光条件下で4週間生育させ、生重量を比較した。その結果、混合光下で生育させた植物は、赤色光のみで生育させた植物に比べ生重量が約3倍増加した(図2)。この微弱な青色光による劇的な生長促進は、フィトクロムやクリプトクロム変異株でも観察されるが、*phot1 phot2* 二重変異株では観察されず、フォトトロピンにより仲介されていることが分かる。この光条件下では、青色光によって野生株では葉緑体が光と垂直な細胞面に集まり、気孔が開き、葉が平らに展開したのに対し、*phot1 phot2* 二重変異株ではこれらの反応が全く見られなかった。このフォトトロピンに依存した生長促進は、照射する赤色光の強度が増加するにつれ減少した。つまり、フォトトロピンは上記の生理応答を同時に誘導することにより植物の光合成を最大にし、弱い光環境のもとで生長を促進す

\* 連絡先 E-mail: kenrcb@mbox.nc.kyushu-u.ac.jp

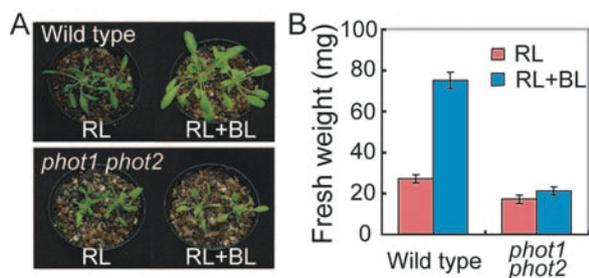


図2 青色光に依存した生長促進

(A) 赤色光  $25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (RL)、赤色光  $25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ と青色光  $0.1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の混合光 (RL+BL) 条件下で5週間生育させたシロイヌナズナ (野生株、*phot1 phot2* 二重変異株) の写真

(B) 同光条件下で4週間生育させた植物における生重量比較  
*phot1 phot2* はフォトトロピンを欠く変異株。

ることが示された。

## 2. 各フォトトロピン生理応答の生長への寄与

フォトトロピンは複数の生理応答を同時に誘導することで、光合成の増大・生長を促進するが、どの反応が最も生長促進に貢献しているのか、手がかりが得られつつある。以前に著者らは、葉の光定位運動が損なわれた変異株のスクリーニングを行い、*nph3* (*NONPHOTOTROPIC HYPOCOTYL3*) 変異株を単離した<sup>2)</sup>。この変異株は、胚軸の光屈性の変異株としてすでに単離されていたものであったが、葉の光定位運動にも関与していることが明らかになった。

*nph3*変異株を前述した混合光条件下で生育させると、赤色光のみの条件下で生育させた場合と比較して、1.5倍程度しか生長が促進されなかった(図3)。*nph3*変異株では、この条件下で正常な葉緑体光定位運動と気孔の開口反応が観察されるが、葉の平坦化は誘導されず、下向きにカールした葉の形になった<sup>2)</sup>。つまり、葉の平坦化と葉の光定位運動が損なわれるだけで、野生株で観察された劇的な生長促進は大きく減少するのである。この結果は、葉の平坦化と光定位が弱光下での生長促進に大きく貢献していることを示している。今のところ、葉緑体光定位運動や気孔開口の生長に対する正確な貢献度は明らかでなく、おそらく、生育条件における光強度の違いによって各反応の貢献度も異なるものと思われる。一方、フォトトロピンを介する情報伝達においてNPH3が葉の平坦化や光定位運動に関与するものの、葉緑体光定位運動や気孔開口に関与しないことは明らかである。今後、フォ

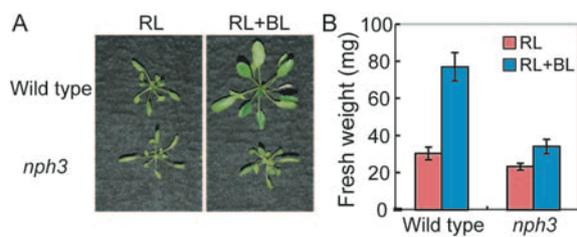


図3 *nph3* 変異株の青色光に依存した生長促進

図2と同じ光条件下で5週間生育させた*nph3* 変異株の写真(A)と生重量比較(B)。

トトロピスが制御する各々の生理応答に特有の情報伝達因子を同定することがこの機構の解明において重要であり、各生理応答の生長促進への寄与の理解にも役立つだろう。

## 3. フォトトロピンの自己リン酸化と生理応答

フォトトロピンは、N末端に青色光を受容する2つのLOVドメイン(LOV1、LOV2)を持ち、C末端にはSer/Thrキナーゼドメインを持つ受容体型のキナーゼである(図4-A)<sup>5)</sup>。最近、大阪府立大学の徳富グループは、以下のようなフォトトロピン分子の活性化モデルを提唱した<sup>6, 7)</sup>。暗黒下ではLOV2ドメインがキナーゼドメインに結合し、キナーゼ活性を阻害している。青色光の受容によってLOV2ドメインがキナーゼドメインから解離すると、同時に阻害も解除され、キナーゼドメインが活性化される。青色光を受容して活性化したフォトトロピンのキナーゼドメインは、自身をリン酸化する「自己リン酸化」反応を示すようになる(図4-B)<sup>8, 9)</sup>。フォトトロピンは元来、青色光に依存してリン酸化される蛋白質として細胞膜中に発見された。そして、この自己リン酸化の程度が、光屈性反応や気孔開口に関わる反応と正の相関を示すことから<sup>10-13)</sup>、自己リン酸化自体が生理応答に必須であると考えられてきたが、長い間この自己リン酸化の生理学的意味は不明のままであった<sup>3)</sup>。最近筆者らは、この問題を解決すべく、フォトトロピンの植物体内における自己リン酸化部位を同定し、機能解析を行った。

青色光を照射したシロイヌナズナの芽生えから免疫沈降法等により*phot1*蛋白質を単離し質量分析を行い、*phot1*の自己リン酸化部位を8箇所同定した(図4-A)<sup>14)</sup>。そのうち3つがLOV1ドメインより上流のN末端領域に、3つがLOV1とLOV2の間のHinge 1領域に、1つ(または2つ)がキナーゼドメインに、1つがキナー

ぜより下流のC末端領域に位置していた。キナーゼドメインのリン酸化は、質量分析の結果からはSer-849とSer-851のどちらがリン酸化されているのか区別出来なかった。以前の間接的な方法を用いた研究から、オートムギのphot1aにおいて、N末端とHinge 1領域が複数箇所ずつ自己リン酸化されるとされていたが<sup>15)</sup>、今回得られたものとその部位は異なっていた。今回の研究で初めてC末端側のキナーゼドメインの中にもリン酸化部位が同定され、その部位はキナーゼドメインの特にアクティベーションループに位置していた。このようにして決定されたphot1のリン酸化部位の役割を以下のように解析した。まず、同定されたリン酸化部位に1つずつ、または2つ以上同時にアミノ酸置換を導入したphot1蛋白質を発現するための遺伝子コンストラクトを作製する。ついで、この遺伝子を、フォトトロピンを欠いた *phot1 phot2* 二重変異株で発現させ、変異phot1蛋白質が上記の生理応答を正常に誘導できるか調べた。もし、正常な反応が回復されれば、変異させたリン酸化部位は重要な役割を果たしていないことになる。その際、リン酸化部位をAlaに置換し、そのアミノ酸の脱リン酸化状態をミミックし、Aspに置換することにより、擬似リン酸化状態とした。その結果、今回同定されたリン酸化部位のうち、キナーゼドメインのアクティベーションループに位置するSer-849とSer-851を同時にAlaに置換したphot1発現株 (S849A S851A-6株) のみが光屈性、気孔開口、葉緑体光定位運動、葉の平坦化の全てを回復しなかった。また、意外なことに、リン酸化部位のうちSer-849とSer-851以外の全てをAlaに置換した変異phot1蛋白質は、野生型phot1と同様にどの生理応答も正常に誘導した。さらに、Ser-849とSer-851の両方をAspに置換したphot1擬似リン酸化株 (S849D S851D-3株) では、どの生理応答もほぼ正常に誘導した。これらの結果は、多くのフォトトロピンの自己リン酸化部位の中で、アクティベーションループの自己リン酸化のみが下流に情報を伝達するために必須で、フォトトロピンが制御する生理応答に共通して必要であることを意味している。

#### 4. アクティベーションループの自己リン酸化とキナーゼ活性の制御

一般的に、プロテインキナーゼのアクティベーションループのリン酸化は、触媒活性の増加と基質蛋白質

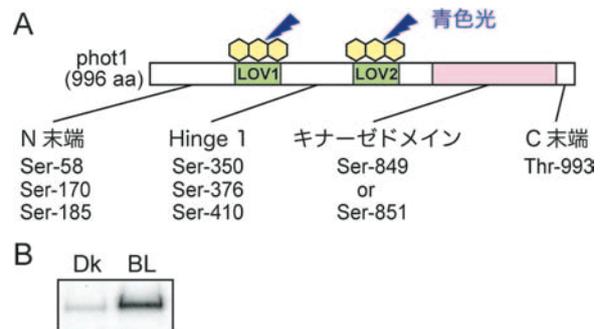


図4 シロイヌナズナのphot1で同定された自己リン酸化部位 (A) フォトトロピンのドメイン構造と同定された自己リン酸化部位

N末端側には2個のLOV (Light, Oxygen, Voltage) ドメインが、C末端側にはセリン/スレオニンキナーゼドメインがある。LOV1より上流をN末端、LOV1とLOV2の間をHinge 1、キナーゼドメインより下流をC末端と呼ぶ。青色光を照射した植物体からphot1蛋白質を集めて質量分析にかけ、リン酸化部位を同定した。

(B) フォトトロピンの自己リン酸化反応を示すオートラジオグラフィ

シロイヌナズナの野生株の黄化芽生えを<sup>32</sup>P正リン酸でラベルし、青色光 (100  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , 30秒) を照射した。phot1蛋白質を免疫沈降法で集め、SDS-PAGEにかけ、オートラジオグラフィでリン酸化を検出した。

の認識に重要であることが知られている<sup>16)</sup>。S849A S851A-6株では、生理応答がほとんど誘導されないにも関わらず、この変異phot1は植物体内でほとんど正常な自己リン酸化活性を有していた (図5-A)<sup>14)</sup>。つまり、この部位の変異は、キナーゼ触媒活性そのものには影響を与えず、下流への情報伝達に影響を与えていることを示唆している。このことから、phot1においてアクティベーションループのリン酸化は、下流の基質蛋白質を認識し、リン酸化するために重要な役割をもっていると考えられる。

さらに、このアクティベーションループ中のSer-851のリン酸化を、特異的抗体を用いて確認した。Ser-851は、暗黒下でもある程度リン酸化されているが、青色光に依存して1分以内にリン酸化レベルが増加した (図5-B)。また、触媒活性を無くした変異phot1蛋白質においては、この青色光に依存したSer-851のリン酸化が観察されず<sup>14)</sup>、情報伝達に重要なアクティベーションループのSer-851は青色光に依存して自己リン酸化されることが確かめられた。phot1擬似リン酸化株S849D S851D-3では、アクティベシ

ンループの自己リン酸化状態をミミックしたが、この株の変異 $phot1$ 蛋白質は暗黒下ではどの部位も自己リン酸化活性を示さず(図5-A)、どの生理応答も誘導しなかった<sup>14)</sup>。これらの結果は、フォトトロピンの情報伝達には青色光によるアクティベーションループの自己リン酸化が必要であるが、この自己リン酸化だけでは不十分であり、リン酸化されてかつ青色光が当たっている必要があることを示している。青色光によるフォトトロピンの自己リン酸化とLOVドメイン等の構造変化が同時に起こることが、下流の基質蛋白質のリン酸化に必要なのかもしれない。

### 5. フォトトロピンの自己リン酸化と生長促進

最後に、S849A S851A-6株とS849D S851D-3株における通常生育条件 ( $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の白色光) 下の生長を示した(図6)。野生型 $phot1$ を発現するWT-11株では、野生株と変わらない生長を示した。これに対し、S849A S851A-6株では、 $phot1 phot2$  二重変異株と差が見られない程生長が著しく損なわれた。S849D S851D-3株ではWT-11と差が見られない。以上のことは、自己リン酸化反応が、調べた全てのフォトトロピ

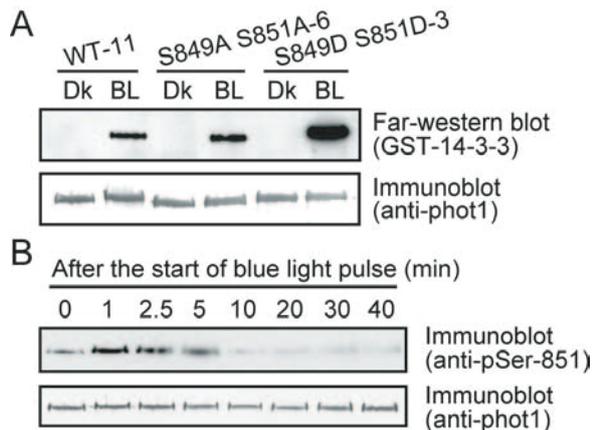


図5 アクティベーションループの自己リン酸化とキナーゼ活性への影響

(A) アクティベーションループのリン酸化変異株における自己リン酸化活性

各植物の黄化芽生えに青色光 ( $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 、30秒) を照射して、植物体内における $phot1$ の自己リン酸化反応を測定した。 $Phot1$ が自己リン酸化すると14-3-3蛋白質と結合することを利用し、 $phot1$ に結合する14-3-3蛋白質の量をFar-Western blotでモニターした。

(B) リン酸化されたSer-851を特異的に認識するpSer-851抗体を用い、青色光 ( $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 、30秒) に対するこの部位のリン酸化の変化をImmunoblotにより調べた。



図6 アクティベーションループのリン酸化変異株における生長

全ての植物は、白色光  $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  で3週間生育させた。黒いバーは、1 cmを示す。

ン依存の反応に必要であるという結果に対応していた。一方、S849A S851A-6株の生長の低減が  $phot1 phot2$  二重変異株と同じであることは、アクティベーションループのリン酸化が損なわれると、全てのフォトトロピン制御応答が起らず、光合成活性が低下してしまい、生長が損なわれることを示唆している。

### おわりに

フォトトロピンは青色光に依存して多様な反応を制御し、これらの全てが光合成を増大させ、生長促進に寄与することが証明され、とりわけ、葉の平坦化と光定位運動が大きな役割を果たしていることが分かった。しかし、同じフォトトロピンという光受容体が異なる反応を引き起こす機構は謎に満ちている。例えば、最も良く解明されている気孔開口と葉緑体光定位運動を比較すると、今までのところフォトトロピン以外の共通因子は見いだせない。各反応はフォトトロピンの直下の成分から分岐しているのだろうか、それともフォトトロピン以外の共通成分が存在するのだろうか。研究の焦点の一つはこの反応分岐のメカニズムである。もう一つの重要な課題はフォトトロピンのリン酸化の基質探しである。世界中の多くの研究者の努力にも拘わらず、フォトトロピンの基質と呼べるものは未だ同定されておらず、この基質の解明がこの分野にブレークスルーをもたらすと期待されている。

### 参考文献

1. Briggs, W, R., Christie, J, M. (2002) Phototropins 1 and 2: versatile plant blue-light receptors. *Trends. Plant. Sci.* 7, 204-210.
2. Inoue, S., Kinoshita, T., Takemiya, A., Doi, M., Shimazaki, K. (2008) Leaf positioning of *Arabidopsis* in response to blue light. *Mol. Plant* 1, 15-26.
3. Christie, J, M. (2007) Phototropin blue-light receptors. *Annu. Rev. Plant Biol.* 58, 21-45.
4. Takemiya, A., Inoue, S., Doi, M., Kinoshita, T.,

- Shimazaki, K. (2005) Phototropins promote plant growth in response to blue light in low light environments. *Plant Cell* 17, 1120-1127.
5. Huala, E., Oeller, P. W., Liscum, E., Han, I-S., Larsen, E., Briggs, W. R. (1997) *Arabidopsis* NPH1: A protein kinase with a putative redox-sensing domain. *Science* 278, 2120-2123.
  6. Matsuoka, D., Tokutomi, S. (2005) Blue light-regulated molecular switch of Ser/Thr kinase in phototropin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 13337-13342.
  7. Tokutomi, S., Matsuoka, D., and Zikihara, K. (2008) Molecular structure and regulation of phototropin kinase by blue light. *Biochim. Biophys. Acta* 1784, 133-142.
  8. Christie, J. M., Reymond, P., Powell, G., Bernasconi, P., Railbekas, A. A., Liscum, E., Briggs, W. R. (1998) *Arabidopsis* NPH1: A flavoprotein with the properties of a photoreceptor for phototropism. *Science* 282, 1698-1701.
  9. Sakai, T., Kagawa, T., Kasahara, M., Swartz, T. E., Christie, J. M., Briggs, W. R., Wada, M., Okada, K. (2001) *Arabidopsis* nph1 and npl1: Blue light receptors that mediate both phototropism and chloroplast relocation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 6969-6974.
  10. Reymond, P., Short, T. W., Briggs, W. R., Poff, K. L. (1992) Light-induced phosphorylation of a membrane protein plays an early role in signal transduction for phototropism in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 4718-4721.
  11. Palmer, J. M., Short, T. W., Briggs, W. R. (1993) Correlation of blue light-induced phosphorylation to phototropism in *Zea mays* L. *Plant Physiol.* 102, 1219-1225.
  12. Salomon, M., Zacherl, M., Rüdiger, W. (1997) Asymmetric, blue light-dependent phosphorylation of a 116-kilodalton plasma membrane protein can be correlated with the first- and second-positive phototropic curvature of oat coleoptiles. *Plant Physiol.* 115, 485-491.
  13. Kinoshita, T., Emi, T., Tominaga, M., Sakamoto, K., Shigenaga, A., Doi, M., Shimazaki, K. (2003) Blue-light- and phosphorylation-dependent binding of a 14-3-3 protein to phototropins in stomatal guard cell of broad bean. *Plant Physiol.* 133, 1453-1463.
  14. Inoue, S., Kinoshita, T., Matsumoto, M., Nakayama, K., I., Doi, M., Shimazaki, K. (2008) Blue light-induced autophosphorylation of phototropin is a primary step for signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 5626-5631.
  15. Salomon, M., Knieb, E., von Zeppelin, T., Rüdiger, W. (2003) Mapping of low- and high-fluence autophosphorylation sites in phototropin 1. *Biochemistry* 42, 4217-4225.
  16. Nolen, B., Taylor, S., Ghosh, G. (2004) Regulation of protein kinases: controlling activity through activation segment conformation. *Mol. Cell.* 15, 661-675.

## 光合成膜ガラクト脂質合成経路の多様性

静岡大学・若手グローバル研究リーダー育成拠点  
粟井 光一郎

## 1. はじめに

酸素発生型光合成を行う生物のチラコイド膜は、例外なく多量のガラクト脂質、モノガラクトシルジアシルグリセロール (MGDG) とジガラクトシルジアシルグリセロール (DGDG) を含んでいる (図1)。MGDGとDGDGは、それぞれチラコイド膜の約50%、30%を占め、両ガラクト脂質を合わせると約80%に達する。これは、細胞膜や葉緑体以外のオルガネラ膜、光合成を行わない生物全般の生体膜が主にリン脂質で構成されていることと大きく異なっている。我々哺乳類も含め、身近な生物全般がリン脂質を主要な膜構成脂質とすることから、ガラクト脂質はマイナーな脂質と思われがちだが、植物や藻類、ラン藻など、光合成生物のバイオマスを考えると、実は地球上で最も豊富に存在する「メジャー」な脂質である。チラコイド膜には他に、酸性糖脂質であるスルホキノボシルジアシルグリセロール (SQDG)、

そして唯一のリン脂質であるホスファチジルグリセロール (PG) が存在する。この脂質組成は、植物や藻類の葉緑体からラン藻まで保存されており、光合成装置の類似性や、葉緑体ゲノムの存在などと合わせ、細胞内共生説の1つの根拠となっている<sup>1)</sup>。なぜこのような脂質組成が保存されているのかは明らかとなっていないが、複雑な膜系であるチラコイド膜の構築に、光合成産物である糖を利用することにより、貴重な資源であるリンを浪費しないための植物の戦略だとする説が有力である。

近年、光合成タンパク質複合体の結晶構造解析が進んだ結果、複合体内部に多数の脂質分子が取り込まれていることがわかってきた<sup>2)</sup>。光化学系I複合体のモノマーには4分子の脂質 (1分子のMGDGと3分子のPG)、光化学系II複合体のモノマーには25分子の脂質<sup>3)</sup> (11分子のMGDG、7分子のDGDG、5分子のSQDG、2分子のPG)、LHCIIのモノマーあたり1分子

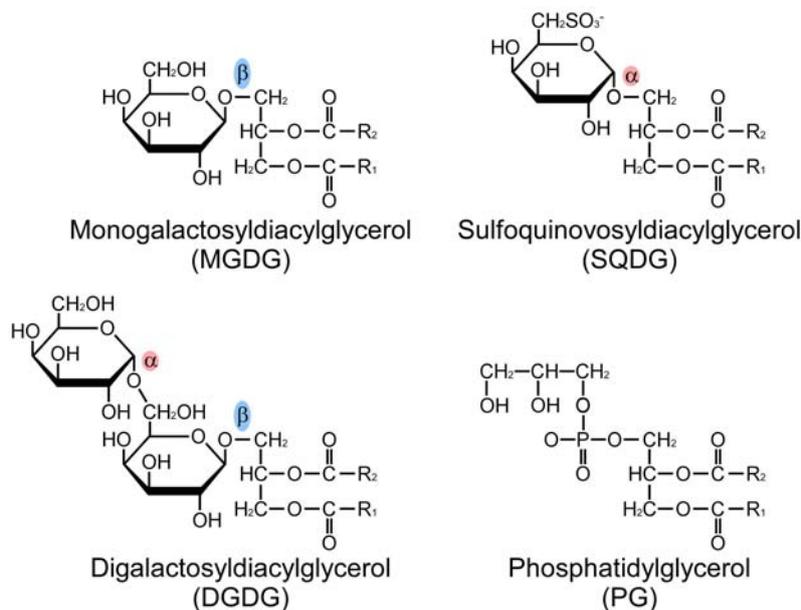


図1 チラコイド膜脂質

α、βは糖の配位する方向を示している。

\* 連絡先 E-mail: dkawai@ipc.shizuoka.ac.jp

のDGDGと1分子のPG、 $b_6f$ 複合体には2分子のMGDGが結合していると予測されている。これらの結果から、ガラクト脂質はチラコイド膜の構築だけでなく、光合成タンパク質複合体の機能発現を通して、光合成機能に深く関わっていると考えられている。

植物のMGDGおよびDGDG合成酵素遺伝子は既に単離され、それらを用いた逆遺伝学的解析から、各脂質の生理学的機能が明らかとなりつつある<sup>4)</sup>。しかし、植物のガラクト脂質は、葉緑体外にも局在することが分かかってきており、他のオルガネラの機能とも関係している。チラコイド膜でのガラクト脂質の生理学的役割を明らかにするためには、より単純な系であるラン藻で合成酵素遺伝子を同定し、その破壊株を用いた解析を行う必要があった。

酸素発生型光合成生物で共通に保存されているガラクト脂質だが、その合成経路はラン藻と植物では異なることが知られている(図2)。植物では、ジアシルグリセロールとUDP-ガラクトースを基質とし、MGDGが合成される。一方ラン藻では、ジアシルグリセロールとUDP-グルコースを基質とし、モノグルコシルジアシルグリセロール(MGlcDG)が合成された後、異性化酵素によってMGDGへと変換される<sup>5)</sup>。実際、植物のMGDG合成酵素遺伝子と有意な相同性をもつ遺伝子は、ラン藻のゲノム上には存在しない。これに対して、DGDGはラン藻、植物共にMGDGとUDP-ガラクトースを基質として合成されると考えられている<sup>5)</sup>。しかし、植物のDGDG合成酵素遺伝子と有意な相同性を持つ遺伝子もラン藻ゲノム上に存在しないことから、ラン藻と植物では、同じ構造の脂質を異なる酵素で合成していると予測されていた。

我々のグループでは、全ゲノム配列の明らかとなっていた2種のラン藻、*Synechocystis* sp. PCC 6803および*Anabaena* sp. PCC 7120を用いて比較ゲノム学的解析を行い、ラン藻のガラクト脂質合成を担う糖転移酵素遺伝子を明らかにしてきた<sup>6,7)</sup>。本稿では、これら

の遺伝子を同定した際に用いた、簡単な「比較ゲノム学的」解析法を紹介し、破壊株を用いた解析からわかった、光合成膜におけるガラクト脂質の機能について論じる。

## 2. ラン藻ガラクト脂質合成酵素遺伝子の同定

これまで、ラン藻が植物と異なる経路でMGDGを合成していることが、生化学的解析により明らかにされていた<sup>5,8)</sup>。そこで、全ゲノム配列の明らかとなっていた単細胞性ラン藻*Synechocystis* sp. PCC 6803と糸状性ラン藻*Anabaena* sp. PCC 7120を用いて、MGlcDG合成活性を調べたところ、確かに両ラン藻で保存されており、同様の糖脂質合成経路が存在することがわかった。ラン藻のSQDGおよびPG合成酵素遺伝子群はすでに明らかとなっており、両ラン藻間で相同性が高いことがわかってきた。つまり、ラン藻のMGlcDG合成酵素遺伝子やDGDG合成酵素遺伝子もラン藻間で高い相同性で保存されていることが期待された。そこで、①糖転移酵素モチーフを持つこと、②ラン藻間で保存されていること、③機能未知であること、の3条件に当てはまる遺伝子を、ゲノムサイズの比較的小さい*Synechocystis* sp. PCC 6803のアノテーションデータから抽出したところ、候補を4遺伝子まで絞り込むことができた。これらを大腸菌で発現させ、活性測定を行った結果、そのうちの1つからMGlcDG合成酵素活性を検出することができた<sup>6)</sup>。また、残りの3遺伝子のうちの1つがDGDG合成酵素遺伝子であることもわかった<sup>7)</sup>。

この解析方法は、ゲノム配列の明らかとなっている数種の生物間で、酵素活性(機能)が保存されていれば、どのような生物にも応用可能である。解析のポイントは、モチーフ検索でどの程度絞り込めるかであろう。実際の解析は、ダウンロードしたアノテーションデータから目的の機能をもつと考えられる候補遺伝子を見つけ出すことから始まる。我々の場合、*Synechocystis* sp. PCC 6803から糖転移酵素モチーフをもつ遺伝子を選んだが、解析の当初、相同性の指標であるE Valueが10以下のモチーフ全てを調べたため、*Synechocystis* sp. PCC 6803の全遺伝子に与えられたアノテーション数は33,000以上になってしまった。これら全てを丸2日かけてチェックし、候補を270遺伝子まで絞り込んだ。ファイル検索機能を使って候補遺伝子を見つけ出すことも可能であったが、

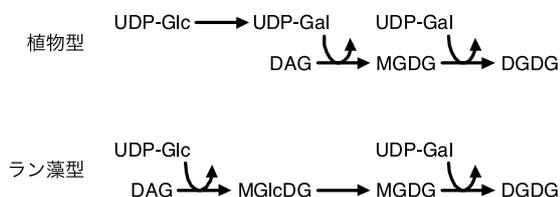


図2 植物とラン藻のガラクト脂質合成経路

見落としの恐れを考え、検索機能でピックアップされなかった遺伝子に関しては、「人力」検索を行った。この候補遺伝子に対してBlast検索を行い、ラン藻で保存されている遺伝子を抽出した。このような作業は骨が折れるが、最近では同様の検索を行うことが出来る便利なサーバも存在するので<sup>9)</sup>、それらを積極的に活用すると、労力を節約できるだろう。

### 3. ガラクト脂質合成経路の進化

同定されたラン藻のガラクト脂質合成酵素遺伝子のうち、MGlcDG合成酵素遺伝子は、その合成経路がラン藻でしか見つかっていないこともあり、他の生物で有意な相同性のある遺伝子は見つからなかった。一方DGDG合成酵素遺伝子は、ラン藻間で保存されていたのに加え、原始紅藻の葉緑体ゲノムにも相同性の高い遺伝子が保存されていることがわかった。全ゲノム配列の明らかとなっている原始紅藻 *Cyanidioschyzon merolae* では、植物型のDGDG合成酵素遺伝子のオルソログは見つかっておらず、恐らくこの葉緑体ゲノム上に存在する、ラン藻型のDGDG合成酵素がガラクト脂質合成を担っていると考えられる。興味深いことに、*C. merolae*の核ゲノムには植物型のMGlcDG合成酵素遺伝子がコードされており<sup>7,10)</sup>、*C. merolae*は植物型とラン藻型両方のガラクト脂質合成酵素を使う中間タイプであるといえる。高等植物や苔類、緑藻では、植物型のガラクト脂質合成酵素遺伝子が保存されていることから、ラン藻から葉緑体へと転換される過程で、ガラクト脂質合成経路も変化していったのであろう。現在のところ、なぜそのような変化が起こったのか、論理的な説明は出来ていない。

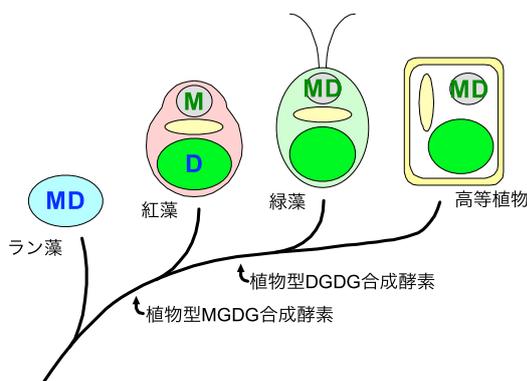


図3 ガラクト脂質合成経路の分布

M : MGlcDG合成酵素遺伝子

D : DGDG合成酵素遺伝子

緑字が植物型、青字がラン藻型を示す。

### 4. チラコイド膜におけるガラクト脂質の生理的役割

ラン藻のガラクト脂質合成酵素遺伝子を同定できたことから、破壊株を用いた解析が可能となった。MGlcDG合成の初発反応を触媒する、MGlcDG合成酵素遺伝子を *Synechocystis* sp. PCC 6803で破壊することを試みたが、残念ながら、全ゲノムコピーが完全に破壊された株を単離することは出来なかった。植物でも、主要なMGlcDG合成を担う *MGDI* 遺伝子を破壊すると、seedling lethal になることが報告されている<sup>11)</sup>。MGlcDGはチラコイド膜の約半分を占め、DGDG合成の基質にもなることから、光合成膜には欠くことが出来ないと思われる。

DGDG合成酵素遺伝子 (*dgdA*) は、我々と同時期に東京大学の佐藤直樹教授のグループでも同定され、*Synechocystis* sp. PCC 6803で破壊株が単離されている<sup>7,12)</sup>。*dgdA*変異株は通常の生育条件では、野生株と比べ生育に変化は見られず、DGDGは通常の培養条件では必須の脂質ではないことがわかった。しかし、強光条件やリン酸欠乏条件では生育が阻害されることから<sup>7,13)</sup>、ストレス条件下に必要な機能を担っているのかもしれない。通常、ラン藻が生育する環境は、実験室の培養条件に比べてリン酸濃度が低いことから（およそ100分の1）、リン酸の少ない環境でチラコイド膜を構築するために、DGDGは重要なであろう。*dgdA*変異株の光化学系II複合体ではDGDGは検出されず、酸素発生複合体を形成する膜表タンパク質が解離している<sup>12)</sup>。また、*dgdA*変異株では光阻害からの回復にも影響が見られることから、DGDGの欠乏によってマンガングラスタが解離しやすくなった結果、光阻害を受けやすくなり、強光条件での生育が阻害されていると予測されている<sup>13)</sup>。

### 5. おわりに

最近、他のラン藻種で *dgdA* 遺伝子の破壊を試みたところ、全ゲノムコピーを完全に破壊することが出来なかった（牧野、渡辺ら、未発表）。このことは、ラン藻でも種によってはDGDGを必須脂質とすることを示している。実際、ラン藻種によって脂質要求性が異なることが報告されており<sup>14)</sup>、それぞれの種によって、光合成タンパク質複合体内で、脂質が必須の機能を担う場所が異なるのかもしれない。この脂質要求性と光合成機能の関係を明らかにするため、現在、

各ラン藻種から光合成タンパク質複合体を精製し、結合する脂質の組成を調べている。

### 参考文献

1. Joyard, J., Maréchal, E., Miège, C., Block, M. A., Dorne, A. J., and Douce, R. (1998) Structure, distribution and biosynthesis of glycerolipids from higher plant chloroplasts, in *Lipids in photosynthesis: Structure, function and genetics* (Siegenthaler, P. A., and Murata, N., eds) pp 21-52, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
2. Jones, M. (2007) Lipids in photosynthetic reaction centres: Structural roles and functional holes, *Prog. Lipid Res.* **46**, 56-87.
3. Guskov, A., Kern, J., Gabdulkhakov, A., Broser, M., Zouni, A., and Saenger, W. (2009) Cyanobacterial photosystem II at 2.9-Å resolution and the role of quinones, lipids, channels and chloride, *Nature Struct. Mol. Biol.* **16**, 334-342.
4. Ohta, H., and Benning, C. (2005) Three enzyme systems for galactoglycerolipid biosynthesis are coordinately regulated in plants, *J. Biol. Chem.* **280**, 2397-2400.
5. Sato, N., and Murata, N. (1982) Lipid biosynthesis in the blue-green alga, *Anabaena variabilis*. I. Lipid classes, *Biochim. Biophys. Acta* **710**, 271-278.
6. Awai, K., Kakimoto, T., Awai, C., Kaneko, T., Nakamura, Y., Takamiya, K., Wada, H., and Ohta, H. (2006) Comparative genomic analysis revealed a gene for monoglucosyldiacylglycerol synthase, an enzyme for photosynthetic membrane lipid synthesis in cyanobacteria, *Plant Physiol.* **141**, 1120-1127.
7. Awai, K., Watanabe, H., Benning, C., and Nishida, I. (2007) Digalactosyldiacylglycerol is required for better photosynthetic growth of *Synechocystis* sp. PCC6803 under phosphate limitation, *Plant Cell Physiol.* **48**, 1517-1523.
8. Sato, N., and Murata, N. (1982) Lipid biosynthesis in the blue-green alga (Cyanobacterium), *Anabaena variabilis* III. UDP glucose:diacylglycerol glucosyltransferase activity in vitro, *Plant Cell Physiol.* **23**, 1115-1120.
9. Sato, N. (2009) Gclust: trans-kingdom classification of proteins using automatic individual threshold setting, *Bioinformatics* **25**, 599-605.
10. Sato, N., and Moriyama, T. (2007) Genomic and biochemical analysis of lipid biosynthesis in the unicellular rhodophyte *Cyanidioschyzon merolae*: lack of a plastidic desaturation pathway results in the coupled pathway of galactolipid synthesis, *Eukaryot. Cell* **6**, 1006-1017.
11. Kobayashi, K., Kondo, M., Fukuda, H., Nishimura, M., and Ohta, H. (2007) Galactolipid synthesis in chloroplast inner envelope is essential for proper thylakoid biogenesis, photosynthesis, and embryogenesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **104**, 17216-17221.
12. Sakurai, I., Mizusawa, N., Wada, H., and Sato, N. (2007) Digalactosyldiacylglycerol is required for stabilization of the oxygen-evolving complex in photosystem II, *Plant Physiol.* **145**, 1361-1370.
13. Mizusawa, N., Sakurai, I., Sato, N., and Wada H. (2009) Lack of digalactosyldiacylglycerol increases the sensitivity of *Synechocystis* sp. PCC 6803 to high light stress, *FEBS Lett.* **538**, 718-722.
14. Aoki, M., Sato, N., Meguro, A., and Tsuzuki, M. (2004) Differing involvement of sulfoquinovosyl diacylglycerol in photosystem II in two species of unicellular cyanobacteria, *Eur J Biochem.* **271**, 685-693.

## 解説

## 光化学系複合体の結晶解析の歴史とタンパク質結晶解析の初歩

東京大学・大学院総合文化研究科・生命環境科学系

池内昌彦\*

## 1. はじめに

タンパク質の結晶構造解析はいうまでもなく、タンパク質の構造と機能を明らかにするもっとも直接的な手法の1つである。しかし、他の生化学や物理化学的測定とはかなりちがうため、分野外の人々にはややわかりにくい。とくに結晶解析の解釈、つまり構造モデルは直観的にわかりやすいデジタル的であるため、別の意味で誤解しやすい。というか、私のような素人には誤解と驚きの連続である。それでも敢えてこの稿を書くのは、結晶解析に限りない魅力を感じるためである。したがって、正確で系統的な記述ができないことはご容赦いただいて、光合成関連の結晶構造解析のイントロダクションとして、初歩的な構造解析のポイントと光化学系複合体の構造解析の歴史を簡潔に概説する。

## (1) 光化学系複合体の結晶解析

光合成における結晶構造解析の転換点はいうまでもなく1984年のDeisenhoferらの光合成細菌 *Rhodospseudomonas viridis* (現在は *Blastochloris* と改名) の光化学反応中心の結晶化と構造決定であった<sup>1)</sup>。この論文はNatureに投稿したがrejectされたという。彼らはこの解析を進めて、構造を初めて詳細に解いて反応中心の構造を初めて決定した。Deisenhoferら(1985) Natureの論文<sup>2)</sup>は1988年のノーベル賞の対象となったことで有名である。このときの分解能は3.0 Åで、アミノ酸側鎖の決定には不十分であった。そのため、著者のMichelは平行して各サブユニットの遺伝子をクローニングし、これによってアミノ酸配列を決定していた。当初の標品は、電子受容体Q<sub>B</sub>キノンが失われていたが、本来のユビキノンが結合したもの、阻害剤の結合したもの、アミノ酸残基をさまざまに置換したものの構造も決定している。また、これをきつ

けに、他の紅色細菌 *Rhodobacter sphaeroides* の反応中心の解析、カロテノイドなどの解析など詳しい研究が進んでいる。

次の転換点は、光化学系I複合体の結晶構造解析であった。1987年にFordらは好熱性シアノバクテリア *Phormidium laminosus* から単離した光化学系I複合体の結晶化を報告したが<sup>3)</sup>、最初の構造モデルは別の好熱性シアノバクテリア *Thermosynechococcus elongatus* 由来の系I複合体で、独のWittらのグループが1992年に名古屋での国際光合成会議で初めて報告した<sup>4)</sup>。Fordらの解析が成功しなかったのは、重原子置換による位相決定ができなかったことによる。Wittらの系Iは12個のサブユニットからなる巨大複合体であったが、当初の分解能は6 Åと低く、アミノ酸残基の同定どころかタンパク質サブユニットの同定もされておらず、わずかに21本の膜貫通 $\alpha$ ヘリックス、45分子のクロロフィル *a*、3個の鉄イオウクラスターが同定できたのみであった(表1)。しかし、この結果は、従来の構造推定がまちがっていないことを実証するとともに複雑な超複合体の構造解析に大きな希望を持たせた。当時、会場で発表を聞いていて、非常に興奮したことをよく覚えている。その後、1996年に4 Åの分解能で決定された構造モデルが発表された<sup>5)</sup>。このとき、ほぼタンパク質サブユニットが同定されたが、まだビタミンK1など重要な補因子の所在は不明であった。さらに、2001年に2.5 Åの分解能の構造モデルがほぼ最終版として2000年のブリスベンでの国際光合成会議で提出された<sup>6)</sup>。この高分解能の構造の決定には宇宙空間の無重力状態での結晶化も含めてさまざまな試みがされたというが、最終結果に貢献したかどうかは、私の英語力では判然としなかった。ともかく、この高分解能の構造によって、ビタミンK1の位

\* 連絡先 E-mail: mikeuchi@bio.c.u-tokyo.ac.jp

表1 光化学系複合体の構造モデルの比較

refereneeces		PDB ID	解像度	TM*1	タンパク質	補因子(Chl*2を除く)	Chl
Krauss et al. 1993	PSI	なし	6 Å	21 TM	?	3 FeS	45 Chl
Krauss et al. 1996	PSI	1PPS	4 Å	31 TM	11 protein	3 FeS	65 Chl
Jordan et al. 2001	PSI	1JB0	2.5 Å	32 TM	12 protein	3 FeS, 2 VK1, 22 carotenoid, 4 lipid, 1 Ca	96 Chl
Zouni et al. 2001	PSII	1FE1	3.8 Å	36 TM	17 protein	1 NH-Fe, 2 Phae, 2 heme, 4 Mn	32 Chl
Kamiya and Shen 2003	PSII	1IZL	3.7 Å	36 TM	20 protein	1 NH-Fe, 2 Phae, 2 heme, 4 Mn	36 Chl
Ferreira et al. 2004	PSII	1S5L	3.5 Å	35 TM	19 protein	1 NH-Fe, 2 Phae, 2 heme, 4 Mn, 7 carotenoid	36 Chl
Loll et al. 2005	PSII	2AXT	3.0 Å	36 TM	20 protein	1 NH-Fe, 2 Phae, 2 heme, 4 Mn, 11 carotenoid, 14 lipid	35 Chl
Guskov et al. 2009	PSII	3BZ1	2.9 Å	36 TM	20 protein	1 NH-Fe, 2 Phae, 2 heme, 4 Mn, 12 carotenoid, 14 lipid	35 Chl
Ben-Shem et al. 2003	PSI-LHCI*3	1QZV	4.4 Å	45 TM	16 protein	2 VK1, 3 FeS	167 Chl
Amunts et al. 2007	PSI-LHCI	2O01	3.4 Å	45 TM	17 protein	2 VK1, 3 FeS, 5 carotenoid	168 Chl

\*1 TM: 膜貫通ヘリックス、\*2 Chl: クロロフィル、\*3 LHCI: light-harvesting chlorophyll complex of Photosystem I.

置やP700を形成するspecial pairの一方がクロロフィル a エピマーであることなど詳細が初めて判明した。また、それ以前の構造モデルにはなかったPsaXタンパク質が登場して、私は非常に驚いた。

一方、光化学系 II の構造解析は光化学系 I の解析ができると分かってからでも困難を極めた。それはMnクラスタを含む水分解系の安定性に問題があったためである。1990年代後半は2次元結晶の電子顕微鏡像から構造を解く試みが為されたが<sup>7, 8)</sup>、最終的には2000年のZouniらの3次元結晶の高分解能X線構造解析がブレイクスルーとなった<sup>9)</sup>。この標品もまた好熱性シアノバクテリア *Thermosynechococcus elongatus* BP-1由来であったが、当初の分解能 (3.8 Å) と、不十分な電子密度のため、あるはずの表在性PsbUタンパク質が全く見えていないなど問題も多かった。これを契機として、酸素発生活性を保持した光化学系 II の結晶構造解析は、日本の沈・神谷グループ、ロンドンのBarberグループ、ベルリンのSaengerグループの激しい競争になっている<sup>10-12)</sup>。まだ、その分解能は2.9 Å~3.6 Å で十分ではないが、さまざまな手法と組み合わせ、詳細な構造が解明されつつある。なお、材料は *Thermosynechococcus elongatus* だけでなく近縁の *T. vulcanus* も使われ、近年はさまざまな突然変異体の結晶構造解析もされている<sup>13)</sup>。これらの構造解析されたものはすべて二量体構造であるが、本来の構造に

ついては疑問もある。しかし、単量体の結晶化はこれまで成功していない。

シトクロムb<sub>6</sub>f複合体も2002年に構造が解かれた。その材料は好熱性シアノバクテリア *Mastigocladus laminosus*とともに常温性の緑藻クラミドモナスでも成功している<sup>14, 15)</sup>。前者の場合、Cramerグループの長年の苦労の積み重ねがあったが、栗栖の参画で結晶化が初めて実現した。そのポイントは、精製された複合体から必要な脂質が除かれているため結晶化しないという予想外の点にあった。一方、クラミドモナスのものはヒスタグを導入した株を用いて、マイルドな条件での精製が有効であった。ともかく驚いたことには、どちらの複合体にもクロロフィル a やβカロテン、新規のc型ヘムが特定の部位に結合していた。生化学的には脂溶性のクロロフィルの膜タンパク質標品への混入と特異的な結合を識別することは至難である。しかし、構造解析によってクロロフィルの位置がシアノバクテリアと緑藻で保存されていることが明らかになり、その機能は不明であっても、単なるartifactではなく進化的に意味があると考えられる。

## (2) 解析の流れ

結晶解析実験の流れは次のようになる。

目的タンパク質の精製→結晶化→X線回折→位相決定→電子密度マップ→構造モデル→精密化

このうち、回折データの取得からモデルの精密化に至るプロセスは素人にはなかなか理解できないこと、最終結果が「構造モデル」であることが、いろいろ誤解を生みやすい。

## 精製

結晶すなわち純粋なものといわれているが、不純物があっても結晶化するものも多い。学生のころ、ルビスコの粗抽出品がすぐに結晶化することを知ってとても驚いたことを新鮮に記憶している。また、不純物が結晶化で除かれることも多いので、結晶化ステップを精製ステップとして利用している例もある。シアノバクテリアの光化学系 II 標品にはアロフィコシアニンがしつこく混入しているが、結晶化で除かれることはよく知られている。また、必要以上に精製をくり返すと、タンパク質分解が起きたり、複合体が解体したりすることもあり、どこまで精製するのか判断は難しい。凝集は結晶化の大敵である。ヒスタグを利用して金属アフィニティークロマトグラフィーで精製すると、金属が共溶出してタンパク質の凝集を引き起こすことがある。また、シトクロム $b_6f$ 複合体では、むしろ精製されたものが結晶化しにくかったという。

## 結晶化

タンパク質の溶液（通常  $10 \text{ mg mL}^{-1}$  以上）を結晶化スクリーニング溶液と混合した後、水をゆっくり除去して、析出するタンパク質を結晶として取得するが、不規則な凝集は使いものにならない。結晶の成長速度も標品によってさまざまである。結晶の大きさは  $20 \mu\text{m}$  以上あれば解析できるというが、大きい方が扱いやすい。しかし、見かけが大きく美しい結晶であっても高い分解能の回折像が得られないこともある。また、異なる結晶が融合した混晶は解析できないが、その結晶を小さく分割することで、単結晶として解析できることも多い。とにかく困るのは、前もって目的タンパク質が結晶になるかどうか予測できないことである。PCRで増幅し大腸菌で発現したところ、PCRエラーを含むタンパク質は結晶化したのが、正しい配列のタンパク質は結晶化しなかったという例まである。

## X線回折

播磨のSPRING-8などの大型放射光で高輝度X線を用いて、ビームを絞ることで、微少な結晶であっても十分な回折データを取得できる。また、大型放射光ではX線の波長を変えて回折像を撮ることで、重原子の位置を知ることができる。一方、X線照射によるMnクラスターの破壊やフラビンの還元などのartifactも起こるので、酸化還元タンパク質の解析にはとくに注意が必要である<sup>16)</sup>。

## 位相決定

X線の回折像から電子密度マップを作成するとき、必要な作業である。ペルーツが考案した重原子置換法だけでなく、セレノメチオニンを利用する方法や既に決定されている類似の構造を元に解く同型置換法などがあり、技術の進歩は日進月歩である。われわれの光受容体タンパク質は重原子置換できなかったが、アポタンパク質の構造決定から同型置換で構造が解けたことには非常に驚いた。

## 電子密度マップ

素人が解釈できる一種の生データである。このマップに合うように原子を置いていくことで、構造モデルが得られる。しかし、この重要なデータは通常は論文には含まれておらず、特別な議論をするときのみその一部だけが提示されることが多い。このようなデータが公開されない理由はモデル化のための解釈が難しいものが含まれているからかもしれない。また、電子密度マップに含まれるすべての密度が構造モデルに取り込まれているわけではないことに留意する必要がある。

## 構造モデル

構造モデルは電子密度マップの解釈である。分解能が高いときは両者はよく一致しているので、あまり問題はないが、分解能が低いときは気をつける必要がある。私自身の苦い経験としては、Kraussら(1996)の光化学系 I の結晶構造に、当時私たちが研究していたサブユニットが存在していなかった<sup>5)</sup>。それ以外の構造は  $4 \text{ \AA}$  の分解能にしては精細で、非常に困惑した。ともかく、当時は基礎知識がなかったので、私たちの標品に問題があると判断して研究をその時点で止めてしまった。ところが、Jordanら(2001)では同じ標品の  $2.5 \text{ \AA}$  モデルでそのサブユニットが PsaX とし

てモデルに登場し<sup>6)</sup>、愕然とした記憶がある。

同様の混乱は、光化学系 II でも起きている。たとえば膜貫通ヘリックスの数と位置がモデルごとに異なっている。これは、標品に含まれるサブユニット組成のちがいによるのか、分解能のちがいによるのか、解釈のちがいなのかまだ判然としない。

構造決定の論文ではモデルと実際の構造は渾然と記述されていることが多い。正確には、論文の筆者は区別しているが、分野外の読者にはわかりにくいというべきかもしれない。解釈が微妙な場合でも、その結果がかなり重要なことでも記されていないことも多い。時々、論文に掲載されている電子密度マップ図は微妙な解釈の妥当性を議論することよりも、論文の重要な結論をモデルだけでなく生データでも示すケースの方が多いように思える。粗い分解能ではアミノ酸側鎖の同定ができないことも多い。そのため、ポリアラニンとしてペプチド鎖をモデル化してあることも多い (PDBではUNKとなっている)。

### (3) 結晶解析論文を読む

#### 分解能

分解能に応じて、組み立てられるモデルの精度が異なっている。たとえば、光化学系 I 複合体の最初の構造である 6 Å 分解能の構造モデルでは、 $\alpha$ ヘリックスのような特徴的な構造がかるうじて見えているだけであって、アミノ酸残基どころか、ループ領域のほとんどは見えていない。クロロフィルのポルフィリン環は分子が大きく扁平で同定しやすいが、それでも半分以下しか捕らえられていない。しかしながら、このレベルであっても特徴的な鉄イオウクラスタの位置とその配置、さらにその直下にある special pair を形成しているクロロフィル分子などを識別することができる画期的なものであった。表 1 には、各光化学系の複合体の探索結果の概略を示したが、分解能の向上とともに帰属される補因子やタンパク質の数の増加が見てとれる。

#### 原子の識別

多くの構造データでは、電子密度が低い H 原子はほとんど見えていない。1.0 Å 以上の分解能が必要である。また、電子密度をみているので、H<sup>+</sup>は見えないことになる。

生物学では重要な N と O 原子の識別にも 1.6 Å 以上

の分解能が必要である。これが識別できないと、グルタミン残基などのアミドの向きを特定できない。アミドではこれらの原子の位置がわからないと、水素結合の有無を議論できない。多くの構造モデルでは、より安定な構造をとるようにアミドの向きを指定しているが、あくまでも仮定である。タンパク質全体の安定化において水素結合などのローカルな安定構造を必ずとっているという保証はない。

#### 酸化還元物質の安定性

光合成や呼吸の反応の多くは酸化還元反応であり、その反応に関与する物質はしばしば X 線の照射による還元を受けることがある。たとえば、光化学系 II の Mn クラスタは X 線によって容易に破壊される。また、フラビンのイソアロキサジン環も還元され、周囲の配位構造も変化するという。このため、結晶の照射部位を変えたり、結晶を頻繁に取りえたりして、X 線の照射時間を短縮する努力が払われている。

#### 決定できない構造

高分解能の構造であっても注意すべき点がいくつかある。すべての構造は均等に見えているわけではない。電子密度を明瞭にとらえられるのは結晶内の繰り返しユニットの構造がそろっているところである。逆にいえばループなど構造がふらふらしているところだけでなく調節酵素のように構造が変化したり、複数のコンフォメーションが共存したりするところははっきり見えない。典型的な例では、シトクロム bc<sub>1</sub> 複合体のリースケ型鉄イオウタンパク質が有名である。つまり、その鉄イオウクラスタが電子を受取るシトクロム b に近い位置と、電子を渡すシトクロム c<sub>1</sub> に近い位置の 2 つの像が同時に得られた<sup>17)</sup>。このことから、鉄イオウタンパク質が約 16 Å 移動して電子を伝達すると考えられている。また、キノンの結合の首振り運動も構造解析から直接推定することができた。

タンパク質の構造が正常に決定されても、特定の部位の構造を決定できないこともよくある。結晶構造は規則的な繰り返し構造として解かれるので、非対称ユニットごとに微細構造が異なっていると解けない。その典型例は膜タンパク質複合体の中の脂質分子の位置である。光化学系 II や系 I の構造内に同定さ

れている脂質分子の数は、標品の化学分析で得られる数値よりもはるかに低いのはこのためである。一方、シトクロム酸化酵素では化学定量に一致した脂質分子が構造内に同定されている。これは分解能が高いことにもよるだろうが、標品から弱く結合した脂質が取り除かれていることを示している。

分子内の局所的な構造の不均一性も構造決定をあいまいにするが、分解能が高いデータでは、ひとつの構造モデルに2種の構造を同時に記載していることもある。これは論文の本文に書かれていないことも多く、PDBデータをみて初めて分かることもある。ともかく既成概念に反する構造モデルに精密化によって到達することも時々あり、PDBデータをみる楽しみでもある。

### 非対称ユニット間のちがいがい

結晶構造は、単位結晶格子の繰り返し構造であり、これにX線を照射したときの回折像は単位格子の回折の積算データとして得ていることになる。さて、この単位格子が1個のタンパク質であればわかりやすいが、複数個入っていることも多い。このような単位格子内の分子セットを非対称ユニットという。非対称ユニット内に複数の同一タンパク質が存在する場合、それぞれの構造は別々に解かれる。これは非常に手間のかかる作業であるが、重要な情報をもたらすことがある。そのもっとも有名な例は、F1-ATPaseである。F1の $\alpha\beta$ 三量体が $\gamma$ サブユニットとの相互作用によって3種の異なる構造をとっていて、ATP加水分解の異なる状態を反映していると考えられている<sup>18)</sup>。

われわれが発表したフラビン型光受容体 TePixD (Th0078) は分子質量 16.5 kDa の小さい水溶性タンパク質であるが、10量体で単離され、その構造は 2.0 Å の分解能で解くことができた。この構造を詳細にみると、分子内シグナリングにおいて重要な役割を果たしている Met93 残基と Trp91 残基の配置はサブユニットごとに微妙にちがっており、そのうちの1つは Met 側鎖の向きが大きく異なっていた。これらは論文中では述べていないが、分子内シグナリングにおけるこれらの残基の動きを反映しているのかもしれない。さらにこの後、このタンパク質のホモログ (Slr1694 もしくは SyPixD) の結晶構造も決定されたが<sup>19)</sup>、この構造モデルには TePixD とは異なる重大なちがいがあっ

た。結晶系が異なるある結晶では、10量体のうちの1つのサブユニット、他方では2つのサブユニットが上記の Met93 と Trp91 の配置が TePixD の場合と逆の関係になっていたのである。これは分子内の特定の部位がおおまかには2種の安定な構造を取ることを示唆しており、非常に興味深い。このような構造の多型の理由は10量体の結晶内のパッキングにおいて、この逆転したサブユニットがとくべつな歪みが加わったことと説明されている。なお、論文での解釈は、この歪みを受けたサブユニットの構造が本来のもので、他の多数のサブユニットの構造が光で活性化された型としている。ともかく、活性調節を受けるタンパク質は構造変化を起こしやすいと考えられ、そのvariationには注意する必要がある。

また、上で述べたシトクロム bc<sub>1</sub> 複合体の鉄イオウタンパク質の2つの異なる像は、非対称ユニット内の構造が2種類あることを示している。

### タンパク質間の境界

タンパク質複合体において、サブユニット間の境界領域における活性部位の形成は構造解析によって初めて理解できるわかりやすい例である。古くは、ルビスコの活性部位が RbcL ホモ二量体の境界にあることは有名である。高等植物のサブユニット構造は L8S8 であるが、光合成細菌では L2 型で存在しており、これが酵素としての最小単位である。またシトクロム b<sub>6</sub>f 複合体のホモ二量体におけるリースケ型タンパク質の鉄イオウクラスタードメインは二量体の相手方の単量体と相互作用している。このため複合体を単量体にするとう電子伝達の活性が失われる。このようなしくみが進化においてどのように獲得されたのかよく分かっていないが、多くのタンパク質で見つかっている。一方、光化学系 II 複合体はシアノバクテリアから高等植物まで広くホモ二量体が分布しているが、単量体でも活性があり、二量体でなければならない理由は分かっていない。また、光化学系 I 複合体はシアノバクテリアでは3量体であるが、真核の緑色植物では単量体であり、3量体化にかかわる PsaL サブユニットの役割も議論されているが、この遺伝子はなぜか高等植物にも存在している。

もうひとつ驚くべき例として、クロロフィル分子の結合部位がある。紅色細菌の光化学系やシアノバクテリアの系 II 複合体では、クロロフィル分子は各サブ

ユニットの内部に埋め込まれており、クロロフィルを結合しないサブユニットと厳然と分かれている。ところが、光化学系I複合体には、予想外のサブユニット (PsaF, PsaK, PsaL, PsaM) が11個のクロロフィルのMgイオンと配位している<sup>9)</sup>。系 II では、このような反応中心以外のサブユニットにはクロロフィルが全く結合していないことを考えると、系 I と系 II は異なる方向へ進化したと考えざるを得ない。もっと驚くべきことは、高等植物の系 I – LHCI 超複合体にある。この構造を見ると、膜を3回貫通する典型的なLHCサブユニット内部にクロロフィルが結合しているだけでなく、LHCサブユニットと系 I コア複合体の境界に10分子のクロロフィルが結合している。これは、LHCサブユニットが系 I のアンテナとして超複合体を形成する進化を遂げたとき、LHCから系 I へのエネルギー転移の効率化のためさらなるクロロフィルの結合が平行して進化したことを意味している。このようなクロロフィルの存在は生化学的なサブユニットの解体実験では実証することができないもので、超複合体の構造解析で初めて明らかになるといえる。

## 参考文献

- Deisenhofer, J., Epp, O., Miki, K., Huber, R., and Michel, H. (1984) X-ray structure analysis of a membrane protein complex. Electron density map at 3 Å resolution and a model of the chromophores of the photosynthetic reaction center from *Rhodospseudomonas viridis*, *J. Mol. Biol.*, *180*, 385-398.
- Deisenhofer, J., Epp, O., Miki, K., Huber, R., and Michel, H. (1985) Structure of the protein subunits in the photosynthetic reaction centre of *Rhodospseudomonas viridis* at 3Å resolution., *Nature*, *318*, 618-624.
- Ford, R. C., Picot, D., and Garavito, R. M. (1987) Crystallization of the photosystem I reaction center., *EMBO J.*, *6*, 1581-1586.
- Krauss, N., Hinrichs, W., Witt, I., Fromme, P., Pritzkow, W., Dauter, Z., Betzel, C., Wilson, K. S., Witt, H. T. and Saenger, W. (1993) Three-dimensional structure of system I of photosynthesis at 6 Å resolution, *Nature*, *361*, 326-331.
- Krauss, N., Schubert, W. D., Klukas, O., Fromme, P., Witt, H. T., and Saenger, W. (1996) Photosystem I at 4 Å resolution represents the first structural model of a joint photosynthetic reaction centre and core antenna system, *Nat. Struct. Biol.*, *3*, 965-973.
- Jordan, P., Fromme, P., Witt, H. T., Klukas, O., Saenger, W., and Krauss, N. (2001) Three-dimensional structure of cyanobacterial photosystem I at 2.5 Å resolution, *Nature*, *411*, 909-917.
- Nakazato, K., Toyoshima, C., Enami, I., and Inoue, Y. (1996) Two-dimensional crystallization and cryo-electron microscopy of photosystem II, *J. Mol. Biol.*, *257*, 225-232.
- Rhee, K. H., Morris, E. P., Barber, J., and Kuhlbrandt, W. (1998) Three-dimensional structure of the plant photosystem II reaction centre at 8 Å resolution, *Nature*, *396*, 283-286.
- Zouni, A., Witt, H.T., Kern, J., Fromme, P., Krauss, N., Saenger, W., and Orth, P. (2001) Crystal structure of photosystem II from *Synechococcus elongatus* at 3.8 Å resolution, *Nature*, *409*, 739-743.
- Kamiya, N., and Shen, J. R. (2003) Crystal structure of oxygen-evolving photosystem II from *Thermosynechococcus vulcanus* at 3.7-Å resolution, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, *100*, 98-103.
- Ferreira, K. N., Iverson, T. M., Maghlaoui, K., Barber, J., and Iwata, S. (2004) Architecture of the photosynthetic oxygen-evolving center, *Science*, *303*, 1831-1838.
- Guskov, A., Kern, J., Gabdulkhakov, A., Broser, M., Zouni, A., and Saenger, W. (2009) Cyanobacterial photosystem II at 2.9-Å resolution and the role of quinones, lipids, channels and chloride, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, *16*, 334-342.
- Kawakami, K., Iwai, M., Ikeuchi, M., Kamiya, N. and Shen, J. R. (2007) Location of PsbY in oxygen-evolving photosystem II revealed by mutagenesis and X-ray crystallography, *FEBS Lett.*, *581*, 4983-4987.
- Kurusu, G., Zhang, H., Smith, J. L., and Cramer, W. A. (2003) Structure of the cytochrome b<sub>6</sub>f complex of oxygenic photosynthesis: tuning the cavity, *Science*, *302*, 1009-1014.
- Stroebel, D., Choquet, Y., Popot, J. L., and Picot, D. (2003) An atypical haem in the cytochrome b<sub>6</sub>f complex, *Nature*, *426*, 413-418.
- Yano, J., Kern, J., Irrgang, K. D., Latimer, M. J., Bergmann, U., Glatzel, P., Pushkar, Y., Biesiadka, J., Loll, B., Sauer, K., Messinger, J., Zouni, A., and Yachandra, V. K. (2005) X-ray damage to the Mn<sub>4</sub>Ca complex in single crystals of photosystem II: a case study for metalloprotein crystallography, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, *102*, 12047-12052.
- Zhang, Z., Huang, L., Shulmeister, V. M., Chi, Y. I., Kim, K. K., Hung, L. W., Crofts, A. R., Berry, E. A., and Kim, S. H. (1998) Electron transfer by domain movement in cytochrome b<sub>c</sub>1, *Nature*, *392*, 677-684.
- Abrahams, J. P., Leslie, A. G., Lutter, R. and Walker, J. E. (1994) Structure at 2.8 Å resolution of F1-ATPase from bovine heart mitochondria, *Nature*, *370*, 621-628.
- Yuan, H., Anderson, S., Masuda, S., Dragnea, V., Moffat, K., and Bauer, C. (2006) Crystal structures of the *Synechocystis* photoreceptor Slr1694 reveal distinct structural states related to signaling, *Biochemistry*, *45*, 12687-12694.

## 解説

## 光化学系IIの例から見る膜タンパク質複合体の結晶化と構造解析

岡山大学・大学院自然科学研究科

沈 建仁\*・川上 恵典

## 1. はじめに

生体内で膜タンパク質及びその複合体は多くの重要な機能を担っている。しかし、水溶性タンパク質に比べ、立体構造が解析された膜タンパク質の数はまだ少ない。現在タンパク質立体構造データベース (PDB) に登録されているタンパク質の構造数は5万個を超え、配列相同性が30%以下の「独立」のタンパク質構造数は約8500個になっているが、そのうち膜タンパク質として帰属されるものは800未満で、「独立」の膜タンパク質の構造数は180程度のみである。即ち、構造解析が行われた膜タンパク質の数はPDB登録数の中の約2%であり、これは、配列が決定された各種生物の全ゲノムにおいて膜タンパク質が全タンパク質の25~30%を占めていることから考えると、極めて小さい割合であると言わざるを得ない。

タンパク質の立体構造解析の主な手法はX線結晶構造解析法であり、この方法によって解析された立体構造はPDBに登録されているものの86%を占めている。膜タンパク質のX線結晶構造解析は1984-1985年にMichel, Deisenhoferらによって紅色光合成細菌の反応中心の立体構造解明が最初の例である<sup>1-3)</sup>。膜タンパク質の構造解析に際して、界面活性剤を用いて高純度・安定で、活性を保ったままの膜タンパク質を調製すること、及びそれを結晶化することが重要なステップであり、構造解析のボトルネックであるとも言われている(水溶性タンパク質についても同じことが言える)。膜タンパク質複合体の場合、バクテリアや昆虫を用いた発現ができないため、複合体の解体なしに適切な界面活性剤を選んで精製すること、及び得られた標品の結晶化条件を見つけることがさらに重要な課題になる。

本稿では好熱性シアノバクテリアの光化学系II複合体(以下PSIIとする)の精製・結晶化を例に挙げ、可溶性・精製の各段階に応じた界面活性剤の選択と、精製標品から良質な結晶を得るための重要な因子である

活性状態・純度・均一性の評価方法、タンパク質の安定性に応じた結晶化方法の最適化による結晶の分解能の向上について紹介し、さらにPSII変異体の構造解析の一例を紹介する。なお、タイトルでは「膜タンパク質複合体」という言葉を用いたが、以下特に記述がない限り膜タンパク質とその複合体は同じように扱うことにする。

## 2. 光化学系II複合体

シアノバクテリア由来のPSIIは17個の膜貫通サブユニットと3つの膜表在性サブユニットにより構成され、分子量約350 kDaの単量体が2個結合した二量体として存在している。3つの膜表在性タンパク質は親水性なので、PSIIは膜タンパク質と親水性タンパク質を含む複合体であることになる。これまで好熱性シアノバクテリア *Thermosynechococcus elongatus* 及び *T. vulcanus* から、3.8-3.0 Å分解能のPSII構造が報告されている<sup>4)</sup>(図1)。分解能が不十分であること、及び回折実験におけるX線損傷の問題から、現在のPSII構造では、水分解・酸素発生反応の機構を十分詳細に解明することができず、結晶分解能の向上とX線損傷を抑制した構造解析が試みられている。以下我々が行ってきた *T. vulcanus* 由来PSIIの結晶化を中心に紹介する。

## 3. PSIIの精製

結晶化に適した膜タンパク質を得るには、対象となるタンパク質を、活性のある、安定な状態で生体膜から取り出すことのできる界面活性剤を選択しなければならない。膜タンパク質複合体の場合、複合体本来の組成を解離させずに精製することが重要である。精製には一般に非イオン性界面活性剤を用いるが、結晶化を目的とした場合、できるだけ結晶化に用いる界面活性剤と同じものを使用することが望ましい(やむをえない場合は精製と結晶化に異なった界面活性剤を用いることもある)。これまでに膜タンパク質の結晶化に

\* 連絡先 E-mail: shen@cc.okayama-u.ac.jp

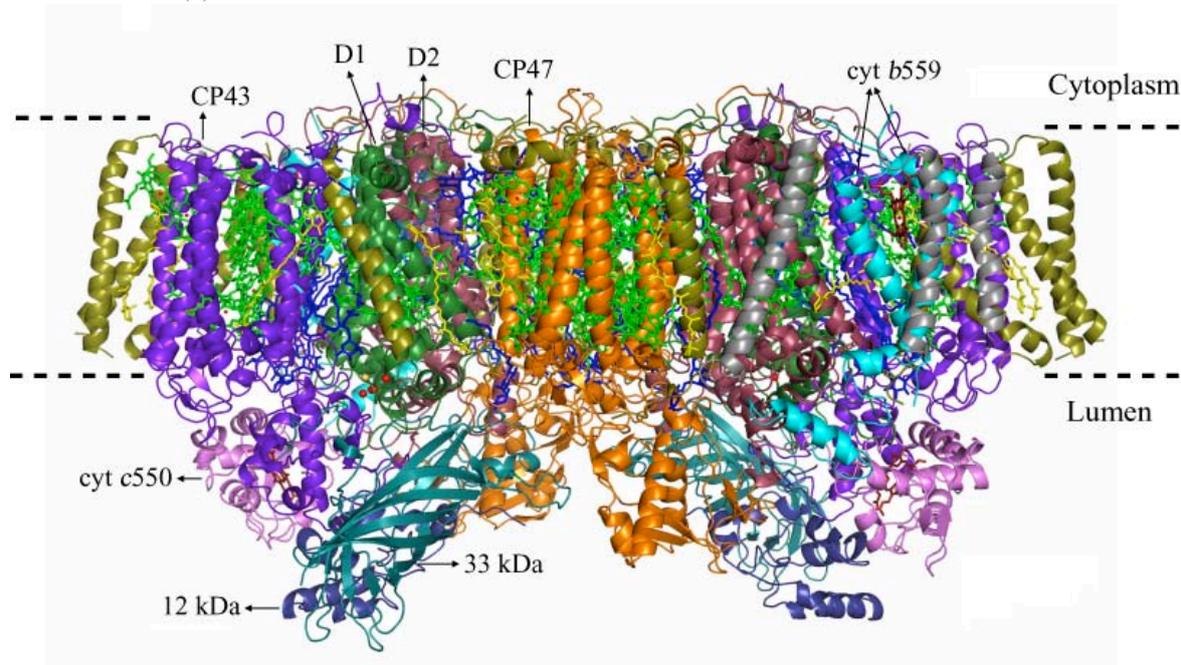


図1 光化学系II (PSII)の3.0 Å分解能の結晶構造<sup>7)</sup>。

破線はそれぞれサイトプラズム側とルーメン側のチラコイド膜表面を示す。

成功した界面活性剤として、C<sub>12</sub>E<sub>9</sub> (polyoxyethylene(9)dodecyl ether), β-OG (n-octyl-β-D-glucoside), β-DDM (n-dodecyl-β-D-maltoside), α-DDM, UDM (n-undecyl-β-D-maltoside), NG (n-nonyl-β-D-glucoside), OM (n-octyl-β-D-maltoside), MEGA10 (decanoyl-N-methylglucamide), LDAO (Lauryldimethylamine-N-oxide)などが挙げられ<sup>8)</sup>、その内αヘリックスタイプの膜タンパク質の結晶化において成功例が最も多いのはβ-DDMで、その次はβ-OGである<sup>8)</sup>。一般に糖とアルキル基をベースにした界面活性剤において、アルキル鎖が長いほど形成されるミセルが大きく、それによって作られる結晶は水の含量が高く、結晶の質が低くなる傾向がある。しかし、アルキル鎖が短い界面活性剤ほど可溶化力が強い傾向があり、膜タンパク質が不安定、あるいは複合体が解体されやすい傾向がある。

従って、実際の精製と結晶化においては、常用の界面活性剤から、対象となる膜タンパク質(複合体)の活性と安定性を最大限に保てるものを選択しなければならない。

PSIIの精製において、我々はLDAOとβ-DDMの2つの界面活性剤を用いた。チラコイド膜にはPSII以外に多くのタンパク質複合体が存在しており、特に光化学系I複合体(PSI)の除去がβ-DDMのみを用いた可溶化では困難であるため、まずLDAOによりPSIIをチラコイド膜から選択的に可溶化し、得られた粗PSII標品をβ-DDMによって再可溶化した後、TOYOPEARL DEAE650MまたはQ Sepharose HPを用いた陰イオン交

換クロマトグラフィーによって結晶化に適した高純度なPSII標品を精製した<sup>9)</sup>。

#### 4. 精製標品の評価

結晶化スクリーニング実験を始める前、及び結晶化において、精製した標品が結晶化に適しているかどうかを常に分析し、評価することは、精製が容易でない膜タンパク質にとって特に重要である。精製膜タンパク質が結晶化に適しているかどうかを判定するためには、標品の活性、純度、均一性、安定性を分析し、評価する必要がある。以下PSIIを例にそれらの分析手法、評価基準について述べる。

##### 4. 1. 活性

X線構造解析の目的は活性を保った状態のタンパク質の立体構造を解明することであるので、結晶化に用いるタンパク質が十分な活性を保っているかどうかを常に分析し、モニターすることが必要である。活性が低いことは、タンパク質の純度が低い、あるいは構造が一部変性、あるいはnative構造と異なっている、と言ったことの現われでもあるので、このような標品は良質な結晶を与えることが困難であると考えた方がよい。細胞内の最適状態での活性を知ることは通常難しいが、複数回の精製を通して目的タンパク質の最大活性を把握し、そのような、あるいはそれに近い活性を持つものを結晶化に用いることを心がけるべきである。PSIIの場合、総合的な活性として飽和光による酸

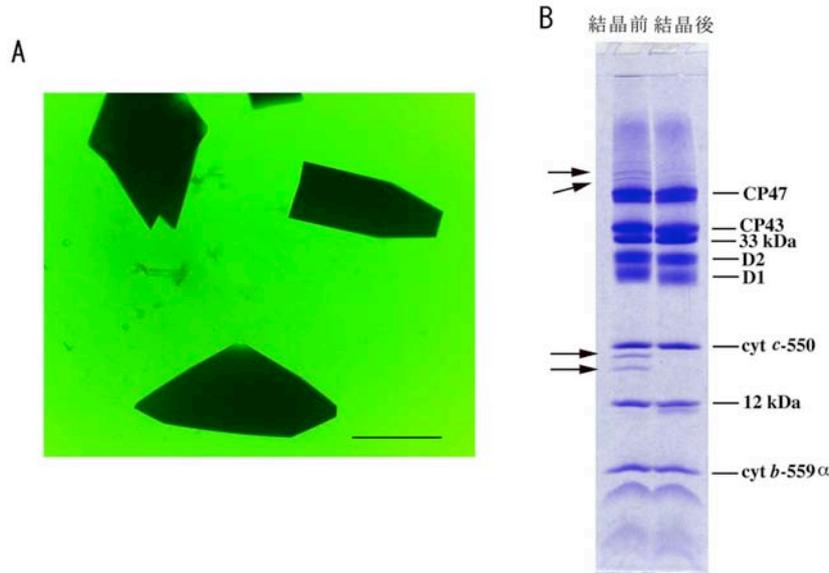


図2 (A) シアノバクテリア *T. vulcanus* 由来PSII二量体の結晶。バーは0.5 mmを示す。(B) 結晶前と結晶化後のPSII二量体のタンパク質組成。結晶化後のPSIIは数個の結晶を溶解して分析したもの。矢印で示したバンドは、結晶化前の溶液試料に存在するが、結晶化された試料になくなった狭雑物である。

素発生の活性を測定し、これまでの経験から *T. vulcanus* から3000  $\mu\text{moles O}_2/\text{mgchl/ml}$  以上の活性を持つ標品を結晶化に用いている。それよりも活性の低いものは最高分解能の結晶を与えていない。

#### 4. 2. 純度

結晶化には標品の純度が高いほどよいが、複合体の場合、精製度を上げるにつれ、結合が弱いサブユニットの部分的解離が起こるといふ複合体特有の問題がある。オリゴマーを形成するタンパク質についても、精製条件を強くすることによってオリゴマー構造が破壊されるなど類似の問題があり、精製手順をどこで止めて結晶化に入るかを適宜判断する必要がある。標品の純度は通常 SDS-PAGE、Blue native PAGE (BN-PAGE)、clear native PAGE (CN-PAGE)<sup>10)</sup>、ゲルろ過などを用いて評価する。サブユニットの解離が活性を低下させる場合は活性測定も1つの手段となる。我々が結晶化に用いたPSIIの純度を図2Bに示した。図から明らかなように、結晶化に用いたPSIIには他のタンパク質のバンドがいくつか残っており(矢印)、必ずしも純度の十分高いものではなかった。カラムクロマトグラフィーのステップを追加してこれらコンタミのバンドを除去しようとする場合、PSII表在性タンパク質の一部が脱落するなど intact なPSIIが得られなくなる問題があった。これ以上精製できないと判断したので、この標品を用いて結晶化を行ったが、ある程度良質な結晶が得られ(図2A)、結晶中にはコンタミのバンドがなくなっていた(図2B、レーン2)<sup>9)</sup>。これは、ある程度

不純物を含んだものでも結晶になりうることを示している。不純物の量を正確に見積もることは容易ではないが、おそらく5%程度以内と思われる。言い換えれば、95%程度の純度であれば結晶化に用いることができる。

しかし、不純物は析出される結晶の質に影響を与えることが考えられ、PSII結晶の分解能が低かったのは不純物の存在が一因と思われたので、現在は再結晶化によって不純物を除去し、当初より良質な結晶を得ることに成功している。

#### 4. 3. 均一性

複合体の結晶化にとって、純度よりも均一性が重要な因子であると考えべきである。これは、結晶が均一な粒子から形成されることを考えると当然であろう。同じ組成の複合体であっても、凝集物や変性物の混在により均一な標品ではなくなる。タンパク質の均一性には電気的な均一性と粒子サイズの均一性から分析・評価する必要がある。

電気的な均一性は、タンパク質の表面電荷に左右され、タンパク質の固有の性質の1つであるので簡単に制御できない。通常、イオン交換クロマトグラフィーを用いて単一ピークとして精製した標品は、電気的にも均一であるとみなすことができる。各種タグを利用してアフィニティークロマトグラフィーによって調製した標品は、イオン交換クロマトグラフィーを用いて電荷的に均一なピークかどうかチェックしておいた方がよい。必要であればイオン交換カラムを用いてさらに

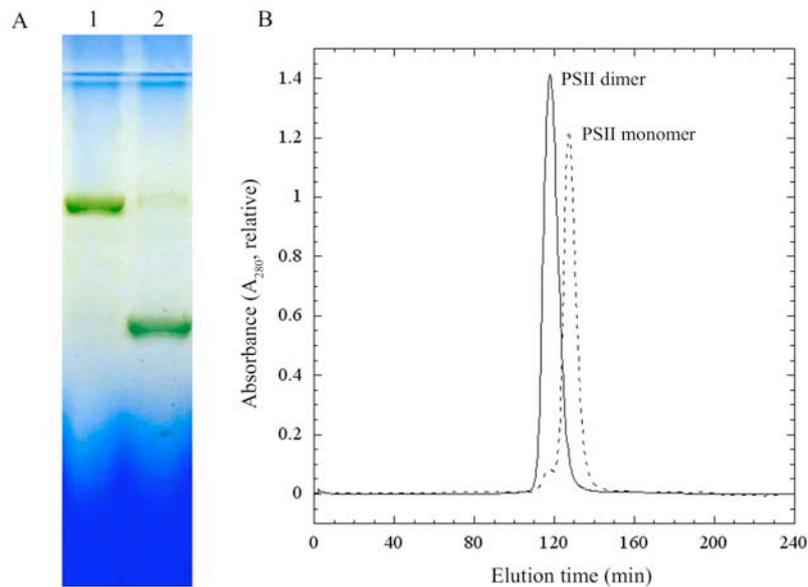


図3 *T. vulcanus*より精製したPSII二量体と単量体のBlue native-PAGE (A)とゲルろ過パターン(B)。

ゲルろ過はSuperdex 200 PC 3.2/30カラムを用い、SMART systemで行った。

精製する。等電点電気泳動を用いて分析してもよいが、等電点電気泳動自身は結晶化標品の精製に適していないので、それによって電氣的に均一でないものが混在していると分かった場合、やはりイオン交換クロマトグラフィーを用いたさらなる精製が必要である。PSIIの場合、陰イオン交換クロマトグラフィーを用いて単量体と二量体を分離し、二量体の単一ピークを分取して結晶化に用いている。

複合体の粒子サイズはサブユニット解離の有無、オリゴマー状態、凝集物・挟雑物の有無などによって影響を受け、結晶化に大きな影響を及ぼす。通常、ゲルろ過、BN-PAGE、CN-PAGEを用いて粒子サイズの均一性を評価する。動的光散乱(Dynamic Light Scattering, DLS)も粒子サイズの分布を評価するのによく用いられ、水溶性タンパク質の場合、monodispersityが高い試料(monodisperseと判断された試料)はほとんど結晶化可能、という報告もある<sup>11)</sup>。膜タンパク質及びその複合体の場合、界面活性剤のミセルが測定妨げになるので、タンパク質とミセル由来のピークを見分けることが必要である。PSIIの場合、BN-PAGEとゲルろ過によって粒子の均一性を評価した(図3)。ゲルろ過において、図3Bに示したような、対称性の高い、狭い単一ピークを示す二量体はよい結晶を与えるが、わずかな広がりを見せるピークを持った標品は良質な結晶を与えない。また、CN-PAGE分析において、高分子量側に凝集物を与えるPSIIはやはり良質な結晶を与えない。

#### 4. 4. 安定性

良質な結晶を得るためには、結晶化溶液の過飽和度をできるだけ低く抑え、時間をかけてゆっくり結晶を析出させる方がよい。しかし、精製タンパク質、特に膜タンパク質やその複合体は多くの場合不安定なので、できるだけ短時間で結晶化したいことが多い。一般的に結晶化は4–20°C、数日–数週間かけて行うので、精製タンパク質が結晶化条件で十分安定かどうかをチェックする必要がある。安定性のチェックには、活性測定、SDS-PAGEによる成分の分解の有無、BN-PAGE、ゲルろ過によるオリゴマー状態の変化などが考えられる。PSIIの場合、20°C、1–2週間程度かけて結晶化を行っていたが、酸素発生活性とSDS-PAGEによる分析から、3–5日以上静置すると、表在性タンパク質の1つである12kDaサブユニットが分解し始め、酸素発生活性も低下した(図4)。これは、回収した結晶の分析からも明らかになった(図2B)。Glycerol、ベタイン、プロテアーゼインヒビターの添加により、12kDaの分解を抑制できたが(未発表データ)、酸素発生活性の低下を完全に抑制することはできなかった。Glycerolは溶液の粘性を増やし、結晶核の析出を抑え、結晶をゆっくり成長させることによって結晶の質を高める効果があるが、十分なサイズの結晶が析出するまでの時間を長くし、不安定なタンパク質に対して必ずしも十分な安定化効果を持っておらず、さらにGlycerolの存在によりできた結晶の含水量が高く、結晶の質が悪くなるなどの可能性がある。従って、Glycerolなどの添加剤を使用するかどうかは個々のケースで判断する必要がある。PSIIの場合、結晶化条件を改良し、4°C、5日以内に析出させることによ

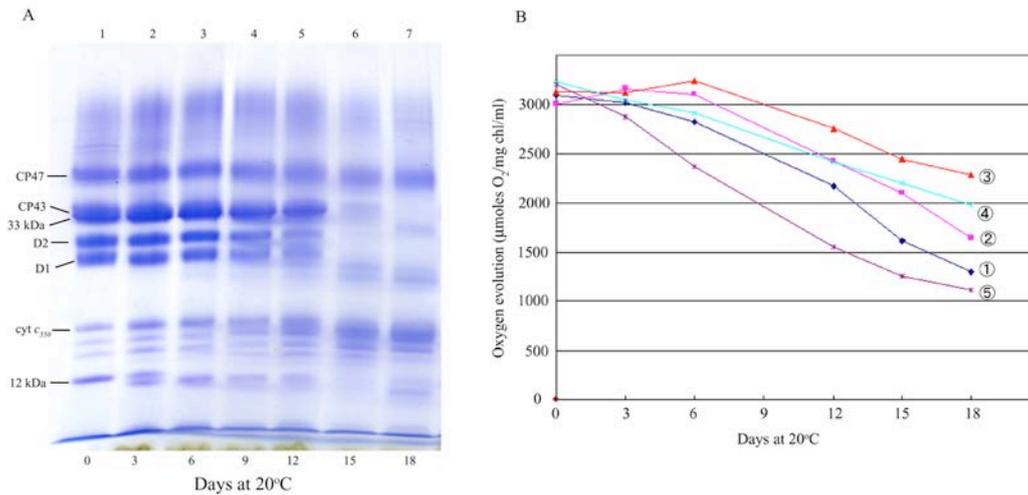


図4 20°C、暗黒におけるPSII二量体の安定性。

(A) コントロール条件 (30 mM Mes pH 6.0, 20 mM NaCl, 3 mM CaCl<sub>2</sub>)におけるPSIIサブユニットの分解。(B) 各種条件下における酸素発生活性の変化。①コントロール (30 mM Mes pH 6.0, 20 mM NaCl, 3 mM CaCl<sub>2</sub>); ②通常の結晶化条件 (コントロール+15% glycerol+5-6% PEG1,450); ③コントロール+8% glycerol+1.0 M Betaine; ④コントロール+1 mM PMSF; ⑤コントロール+2%ベンズアミジン。

て、これまで最良の結晶を与えることが分かった。

## 5. PSIIの結晶化

タンパク質の結晶化方法は様々あり、最もよく使われているのは蒸気拡散法としてのハンギング・ドロップ法またはシッティング・ドロップ法である。他にはバッチ法、二液バッチ法、透析法、界面拡散法などがある。膜タンパク質の場合、蒸気拡散法は沈殿剤とともに試料中の界面活性剤も濃縮されるので、それによって相分離が起こり、結晶化の妨げになることがある。一方、バッチ法や透析法は最終条件をコントロールでき、界面活性剤が濃縮されることはないが、バッチ法では結晶析出の範囲が狭く、透析法はセッティングに時間がかかったり多くの条件を一斉にスクリーニングしにくいと言った問題があり、いずれも初期結晶化条件のスクリーニングには適していない。従って、どの方法を使うかは扱うタンパク質の安定性や結晶析出の再現性などを検討する必要がある。結晶化の際の温度も重要なパラメーターの1つであり、通常4°Cと20°Cを試す。

PSIIの場合、初期の結晶化は20°C、キャピラリーチューブを用いた微量透析法でサンプル溶液として4.0 mg chl/ml, 20 mM Mes (pH 6.0), 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 20 mM NaCl, 20 mM MgSO<sub>4</sub>, 外液に20 mM Mes (pH 6.0), 20 mM NaCl, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 40 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.015% β-DDM, 5-7% PEG1450を用いて行った<sup>9)</sup>。その結果、1-2週間で1.0 x 0.5 x 0.1-0.2 mmサイズの結晶ができ、3.7 Å分解能の回折データが得られ、それに基づき構造解析が

行われた<sup>5)</sup>。しかし、上述したように、20°C、1-2週間では12 kDaサブユニットの分解が起こり、酸素発生活性が部分的に低下したので<sup>9)</sup>、これ以上の分解能の向上は見られなかった。そのため、透析法よりも短時間で結晶を析出させることができるハンギング・ドロップ蒸気拡散法を用いて、高純度・高活性の試料から3-4日で結晶を析出させることによって、分解能3.3 Åの回折データを得た。さらに4°Cで結晶化を行い、1日で析出した結晶を回収し、オイルバッチ法を用いた再結晶化と抗凍結剤置換の条件を最適化することによって、最高分解能 2.74 Åの回折スポットを与え(図5)、フルデータセットとして3.0 Å分解能を与える結晶を析出させることに成功した。

## 6. PSII変異体の結晶構造解析

PSIIは 5 kDa 前後の「低分子量」サブユニットを13個持っており、そのうちの多くの機能は解明されていない。さらに現在報告されている結晶構造において、3つの膜貫通ヘリックスの帰属が決定されていない。変異体の結晶構造解析によって、サブユニットの位置や機能に関する情報を取得することが可能であり、我々はPsbY欠失株からPSII二量体を精製し、野生株とほぼ同様の条件で結晶化し、野生株との差フーリエ図から、PsbYは3.0 Å分解能の構造におけるX1に対応することを同定した(図6)。現在の分解能では、PsbYの欠失によるPSII変異体の構造変化を特定することはできないが、分解能の向上により変異体における構造変化を検出し、PSIIにおけるPsbYの機能を明

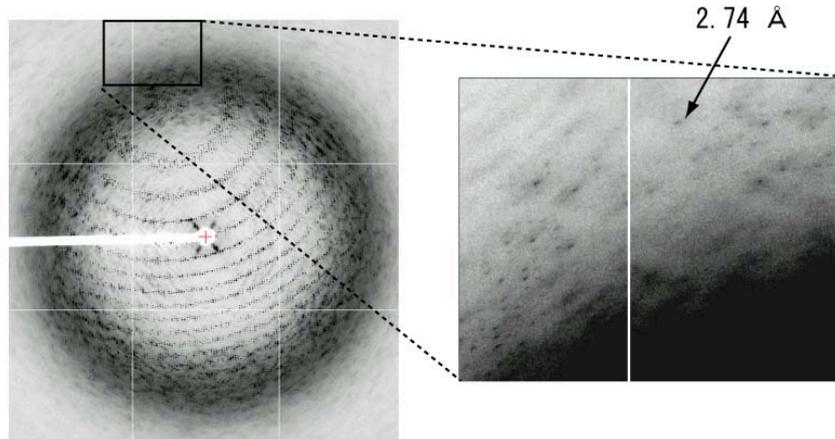


図5 PSII結晶のX線回折像(左)とその一部の拡大図(右) (最高分解能2.74 Åの回折点を矢印で示した)。

らかにすることができると期待している。

## 7. 終わりに

タンパク質の結晶化のため、スクリーニングキットが複数市販され、微量の試料を扱うことができる結晶化ロボットも利用できるようになり、さらに放射光技術や解析技術の進歩により、構造解析の速度が著しく速くなり、タンパク質の大量構造解析の時代が到来したという感がある。膜タンパク質に関しても、Michelらが光合成細菌反応中心の結晶化に初めて成功した時には、構造解析された膜タンパク質が数年に1個、あるいは1年に1個程度であったが、最近では年に十個を超える数が報告されるに至った。膜タンパク質及びその複合体の結晶化は、いかにタンパク質の立体構造を

保ったまま生体膜から取り出して高純度な標品を精製し、そのタンパク質に見合った結晶化条件・方法を見つけるかにかかっている。そのため、実験材料が大量に入手できることを前提に、可溶化に適した界面活性剤の選択、各精製段階の最適化による高純度、高均一性、高活性標品の精製、そしてタンパク質の安定性を保った条件下での最適結晶化条件・方法の探索が重要な課題になる。

PSIIの結晶構造の現在の分解能は3.0 Åであり、この分解能ではPSIIの全アミノ酸残基の側鎖構造を決定するには不十分である。特に酸素発生反応の中心であるMn<sub>4</sub>Caクラスターは、X線照射による損傷を受けるため、十分詳細な構造が解明されていないのが現状である。再現性良く2.7 Å分解能を超える結晶を析出させることが出来れば、複数の結晶を用いて1個の結晶あたりに照射するX線ドーズを著しく低く抑えることで、損傷をより低減したMn<sub>4</sub>Caクラスターの構造を解明することができると期待されている。

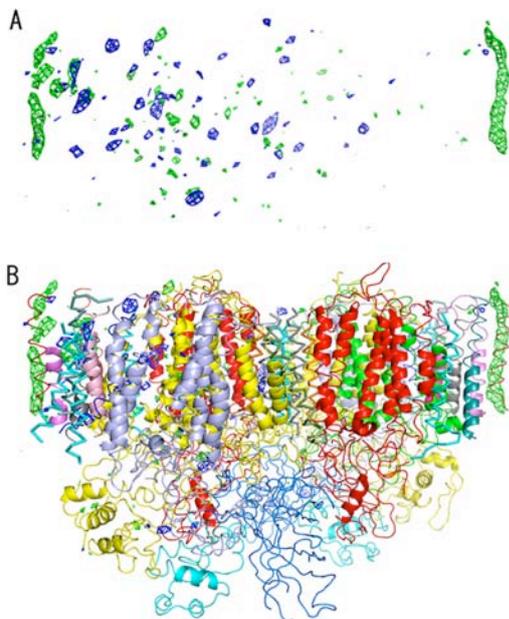


図6 A. 野生株PSIIからPsbY変異株PSIIを差し引いた差フーリエ電子密度図。緑はプラスの電子密度を、青はマイナスの電子密度を表す。B. Aの電子密度を3.7 Å分解能のPSII結晶構造<sup>2)</sup>と重ね合わせたもの。

## 参考文献

1. Deisenhofer, J., Epp, O., Miki, K., Huber, R., and Michel, H. (1984) X-ray structure analysis of a membrane protein complex: electron density map at 3 Å resolution and a model of the chromophores of the photosynthetic reaction center from *Rhodospseudomonas viridis*, *J. Mol. Biol.* 180, 385-398.
2. Deisenhofer, J., Epp, O., Miki, K., Huber, R., and Michel, H. (1985) Structure of the protein subunits in the photosynthetic reaction center from *Rhodospseudomonas viridis* at 3 Å resolution, *Nature* 318, 618-624.
3. Deisenhofer, J., and Michel, H. (1985) The photosynthetic reaction center from the purple bacterium *Rhodospseudomonas viridis* (Nobel Lecture), *EMBO J.* 8, 2149-2170.
4. Zouni, A., Witt, H. T., Kern, J., Fromme, P., Krauß, N.,

- Saenger, W., and Orth, P. (2001) Crystal structure of photosystem II from *Synechococcus elongatus* at 3.8 Å resolution, *Nature* 409, 739-743.
5. Kamiya, N., and Shen, J. R. (2003) Crystal structure of oxygen-evolving photosystem II from *Thermosynechococcus vulcanus* at 3.7-Å resolution, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 98-103.
  6. Ferreira, K. N., Iverson, T. M., Maghlaoui, K., Barber, J., and Iwata, S. (2004) Architecture of the photosynthetic oxygen-evolving center, *Science* 303, 1831-1838.
  7. Loll, B., Kern, J., Saenger, W., Zouni, A., and Biesiadka, J. (2005) Towards complete cofactor arrangement in the 3.0 Å resolution structure of photosystem II, *Nature* 438, 1040-1044.
  8. Iwata, S. (2003) Crystallization informatics of membrane proteins, In Iwata, S. (ed.), *Methods and Results in Crystallization of Membrane Proteins*, pp. 281-297, International University Line, La Jolla, California.
  9. Shen, J.-R., and Kamiya, N. (2000) Crystallization and the crystal properties of the oxygen-evolving photosystem II from *Synechococcus vulcanus*, *Biochemistry* 39, 14739-14744.
  10. Wittig, I., Karas, M., and Schägger, H. (2007) High resolution clear native electrophoresis for in-gel functional assays and fluorescence studies of membrane protein complexes, *Mol. Cell. Proteomics*, 6, 1215-1225.
  11. Ferré-D' Amaré, A.R., and Burley, S.K. (1997) Dynamic light scattering in evaluating crystallizability of macromolecules, *Methods in Enzy.* 276, 157-166.

## 解説

## 不安定なタンパク質を見る

大阪大学・大学院理学研究科

福山恵一\*

## 1. はじめに

タンパク質の機能や性質を理解する上で、その立体構造情報は極めて重要で、必須ともいえる。このことは光合成分野に限らず、生物科学の広い分野に共通していることであろう。立体構造をみることにX線結晶解析が果たしている役割が非常に大きいことに異論はないであろう。

ところで、タンパク質を代表とする生体巨大分子や複合体の立体構造は静止していない。「機能する」ということは、他の分子と相互作用し、構造変化をしていることに他ならない。X線結晶解析がなされると確かに「ある状態の構造」がみえるが、タンパク質分子がどのように構造変化し、これが機能とどう結びつくかを理解したいという欲求がさらに生ずるのも自然な流れである。このようなことにX線結晶解析法でどこまで迫れるのか、どのようなことをクリアすれば達成できるかをここで述べてみたい。

## 2. X線結晶解析で何がみえているのか？

X線結晶解析は、調製した結晶にX線を照射し、そこから散乱（回折）されるX線を記録し、この回折データから原子位置などの構造情報を得る方法である。この方法は、構造決定しようとしている分子が結晶状態であることを前提として、理論が組み立てられている。結晶とは、同一の立体構造をとった分子が周期的に配列したものである。X線結晶解析で直接みえるものは「空間的および時間的平均」の電子密度である。結晶中の分子配列に乱れが無く、実験中に構造変化しなければ、この方法は分子を構成する各原子の位置を極めて正確に（誤差が0.01 Å以下の精度で）決定できる。タンパク質のような巨大分子でも、最も見えにくいとされる水素原子をもみることができ。しかし反面、局所的にせよコンフォメーション

が多様であったり、経時的に構造変化すると、該当領域の電子密度はぼやけ、ひどくなると電子密度が全くみえなくなる。

一般に、タンパク質分子は溶液中でも結晶中でも構造がゆらいでおり、さらに基質等の小分子や他のタンパク質やDNAと相互作用すると、大きな構造変化が起こるのが普通である。それではX線結晶解析という方法で、どのようにしてタンパク質の構造をみればいいのか、動きを捉えられるのか、またこの方法から得られた結果をどう評価したらいいかについて概説する。

3. 例1：化学的に不安定な分子をみる<sup>1,2)</sup>

この種の分子の構造をX線結晶解析でみる場合、結晶を構成する分子を立体的に均一にし、回折実験中不変に保つことが必要である。つまり、変化しやすい分子を「どの状態に揃えるか」がポイントになる。ここでは、不安定な鉄硫黄（FeS）クラスターを保持したIscUタンパク質を例にあげ、どのようにして立体構造をみるのができたか、そしてこの構造から得られた知見の科学的評価を述べる。

FeSクラスター形成やFeSタンパク質の成熟化にはタンパク質群が関与しており、その一つがISCマシナリーである（図1A）<sup>3)</sup>。IscUはISCマシナリーの必須の成分であり、他の成分タンパク質と協調的に働き、FeSタンパク質をアポ型からホロ型へと成熟化させる。FeSクラスターには[2Fe-2S]や[4Fe-4S]等があるが、ISCマシナリーはどのタイプのクラスターにも対応するという特徴がある。これまでの分子遺伝学や生化学的解析から、IscU中でFeSクラスターが一時的に形成され、これがアポ型FeSタンパク質に渡されるとされている。このような機能から容易に想像がつくように、IscUは様々な状態をとり、構造（状態）変化

\* 連絡先 E-mail: fukuyama@bio.sci.osaka-u.ac.jp

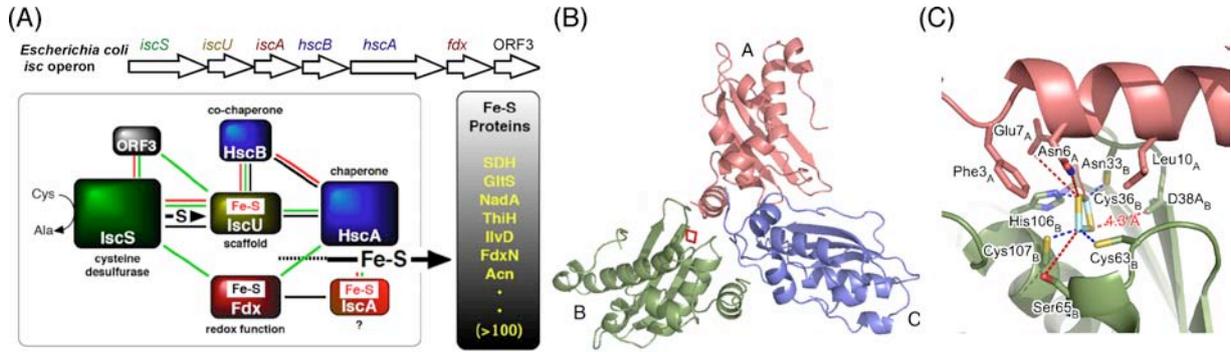


図1. ISCマシナリーとその成分タンパク質IscUの構造

(A) 大腸菌ではiscSUahscBAfdxはオペロンをなし、対応するタンパク質が協調的に働くことによってFeSタンパク質がホロ型になる。IscUはscaffoldタンパク質である。成分間に引いた線は様々な方法で検出された相互作用を示す。(B) [2Fe-2S]クラスターを結合したIscU (D38A変異体) の非対称な三量体構造。同一のポリペプチドでありながら互いに異なるコンフォメーションをとり、一つのサブユニットのみがFeSクラスターを結合している。(C) [2Fe-2S]クラスター近傍の構造。緑がBサブユニット、赤がAサブユニットを示す。Cys36とHis106が一方の鉄原子に、Cys63とCys107が他方の鉄原子に結合している。BとCは文献2より転載。

しやすいが故に「機能的」であるといえる。我々はFeSクラスターを保持した状態のIscU (FeS-IscU) の構造をみるのがIscUの分子機構解明の第一歩であると位置づけ、この構造を捉えることに焦点をあてた。それまでの経験から大腸菌FeS-IscUはきわめて不安定であったので、以下のように順次取り組んだ。

- 1) 幾つかの生物種について、安定なFeS-IscUをスクリーニングし、*Aquifex aeolicus* 由来のIscUを選択した。
- 2) このIscUを大腸菌で発現させるとFeSクラスター特有の色を持つタンパク質が生成した。嫌気的条件下で操作すると、このFeSタンパク質が精製できたが、かなりの割合でFeSが分解しているようであった。
- 3) さらに安定化させるため、*Azotobacter vinelandii* のIscUに倣って、*A. aeolicus* のIscUにD38Aという変異を導入した。この結果、このFeS-IscUはより安定になり、嫌気チャンバー内で操作することにより精製と結晶化に成功した。この結晶は、大気中ですばやく急速凍結すれば、その後は通常の結晶と同様に扱っても長期間安定であった。

本X線結晶解析から、予期していなかった構造が現れた。それまではIscUの二量体の中央でFeSが形成されると考えられていたが、FeS-IscUは非対称な三量体を形成し、一つのサブユニットの表面にFeSが結合し、残る二つのサブユニットはFeSを持たずに、別のサブユニットが持つFeSを覆っていた(図1B)。すなわち、一つはFeS形成の場を提供し、残る二つは異なるコンフォメーションをとってFeSの保護や転移に

寄与しているように見え、同じポリペプチドでありながらそれぞれのサブユニットは異なる役割を果たしていると考えられた。詳細は省略するが、IscUの生化学的解析と合わせて、IscUはオリゴマー状態を変えてFeSを形成・転移させているという、新しい分子機構を提唱した。

図1CにFeSクラスター近傍の構造を示したように、FeSには3つのCys残基と一つのHis残基が配位している。これらの残基に加えて、Asp38(ここではD38A変異体なのでAla38となっている)をはじめFeSクラスターを結合しうるアミノ酸残基が近くに点在する(図1C中赤破線)。IscUの機能から、FeSがIscUに結合する様式は幾つかあり、形成された(されつつある)FeSクラスターはIscUの中で順次移動して、最終的にターゲットとなるアポ型FeSタンパク質に渡るのであろう。D38Aは形成されたFeSクラスターが固定される変異体で、このため安定になったと解釈できる。事実、この変異によりIscUの機能が損なわれる。本解析では、機能しているIscUの一つのスナップを捉えたと考えている。

IscUに限らず、タンパク質が働く様を動画としてみたいのであれば、各状態の構造を捉え、これらを繋ぐ必要がある。映画の場合と同じである。

#### 4. 例2-1：酵素反応の中間体を捉える<sup>4)</sup>

図2Aに示すように、 $\gamma$ -グルタミルトランスペプチダーゼ(GGT)は2段階で、基質中の $\gamma$ -グルタミル基を加水分解・転移する反応を触媒する<sup>5)</sup>。一般に、2

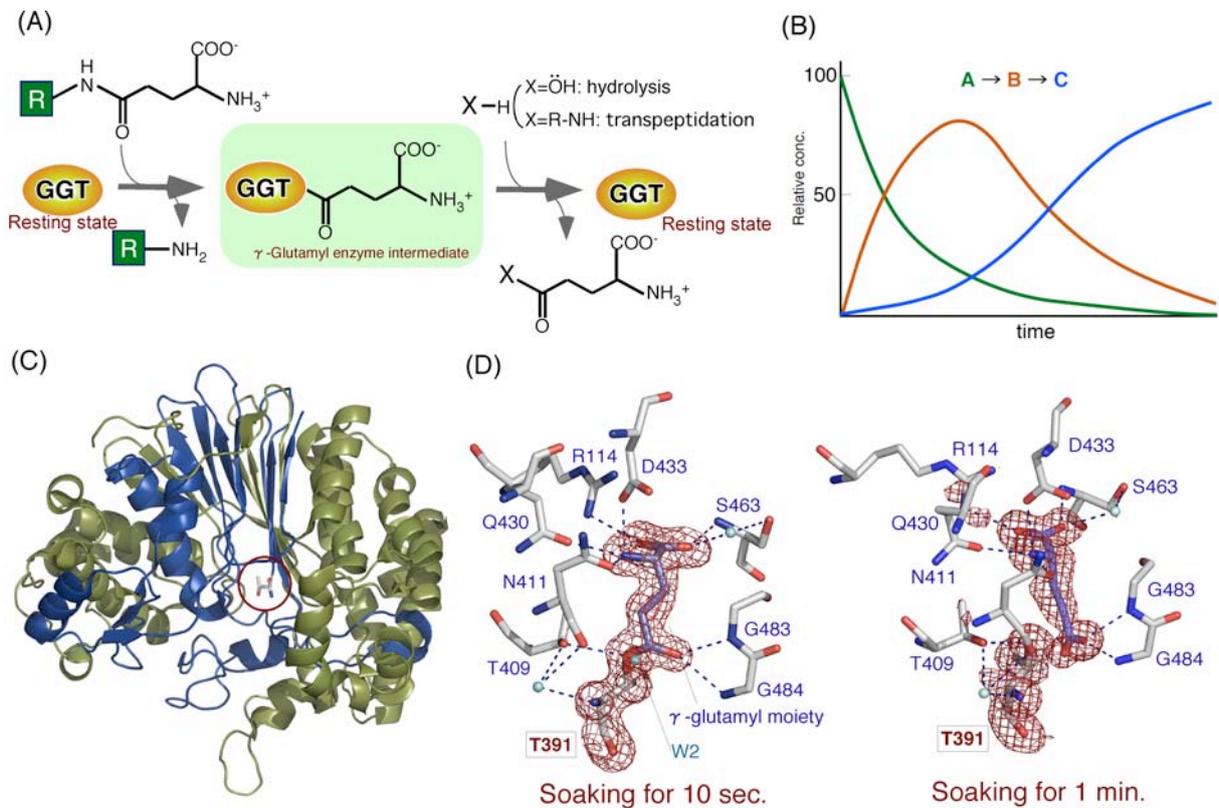


図2. GGTの反応と構造

(A) GGTの2段階反応。一段階目の反応後に、GGTの活性残基(Thr)と基質に由来する $\gamma$ -グルタミル基が結合した $\gamma$ -グルタミル酵素中間体が生成する。(B) 2段階反応における3状態の構成比率の経時変化。(C) 大腸菌GGTの立体構造。中央(赤丸)に活性残基Thr391がある。緑:L-サブユニット、青:S-サブユニット。(D) GGT結晶を基質溶液に一定時間ソーキングした後の電子密度。

段階反応の場合、反応前、中間体、反応後にある状態の構成比の経時的変化は図2Bのようになる。X線結晶解析では、時間的・空間的平均の電子密度がみえるのであるから、回折測定に供する結晶中の分子種(の大多数)をいずれかの状態に揃えれば、それがみえることになる。

よく知られているように、タンパク質結晶はかなりの割合で水を含んでおり、タンパク質分子間には小分子やイオンが浸透できる水路がはり巡らされているようなものである。酵素結晶を低分子基質の溶液に浸せば、もし反応部位が水路に面していれば結晶中で反応が起こり、これによって結晶を壊すような構造変化がなければ、X線結晶解析できる。

ここでは大腸菌由来GGT結晶を、基質であるグルタチオンの溶液に様々な時間浸し、それぞれの結晶を急速凍結して反応を停止させた。それぞれの結晶について回折データを収集し、構造解析したところ、約10秒間グルタチオン溶液に浸した場合に、活性残基Thr391のO $\gamma$ 原子に $\gamma$ -グルタミル基がエステル結合でつ

ながっている電子密度がみえた(図2C,D)。すなわち、 $\gamma$ -グルタミル-酵素中間体を捉えたといえ、どのように $\gamma$ -グルタミル基がGGTに認識されているかが明らかになった。なお、本解析より前に、ヒトGGTで機能が損なわれる変異体が幾つか報告されていたが、ここで指摘されていたアミノ酸残基は $\alpha$ 位のアミノ基とカルボキシル基を認識している残基であった。本構造解析で特筆すべきは、この中間体のカルボニル炭素を攻撃するに適した位置に水分子(図2D左中のW2)がみえていることである。また、カルボニル酸素は2つのGly残基のNHと水素結合し、この後この中間体が加水分解される際にとる四面体形遷移状態を安定化するオキシアニオンホールの位置にある。より長くグルタチオン溶液に浸したGGT結晶では、Thr391O $\gamma$ と $\gamma$ -グルタミル基との間の結合は切れていた(図2D右)。ここでは $\gamma$ -グルタミル基のC $\alpha$ -C $\beta$ とC $\beta$ -C $\gamma$ 結合のねじれ角が変化しており、加水分解後はこのように生成物が構造変化・遊離し、酵素は休止状態に戻るであろう。

このような一連の解析から、GGTでは一段階目の反応が早く、2段階目の反応が遅い（結晶中で遅くなった）といえ、これ故に中間体が捉えられた。ここでとった方法では、GGTとグルタチオンとのES-complexの構造を捉えることは無理であった。なお、中間体の電子密度がみえたが、結晶中で何%がこの状態にあるか、結晶の表面と中心部での構成比率について定量的なことは何ともいえない。この結晶の場合、予想以上に早く基質が結晶中に浸透し、これが幸いして中間体が捉えられたという印象は強い。

### 5. 例2-2：より不安定な酵素反応の途中の状態を捉える<sup>6)</sup>

ここではヘムオキシゲナーゼ（HO）を用いて、より不安定な状態を捉えた方法を紹介する。HOはヘム代謝で主要な役割を担っている酵素で、 $O_2$ と還元力を利用して、ヘムの $\alpha$ 位を特異的に開裂させる反応を触媒する。この反応は3段階からなり、各段階で $O_2$ を一分子用い、最終的にビリベルジン、CO、 $Fe^{2+}$ を生じる（図3A）<sup>7)</sup>。ヘムはHOにとって基質であると共に、補酵素でもある。注目すべきは2段階目で生じるCOである。よく知られているように、COは $O_2$ よりはるかに強くヘムやその誘導体に結合する性質を持っている。発生したCOが存在する中で、3段階目

でHOは $O_2$ をどのように選択しているのであろう？HO中のヘムにCOが結合しにくい分子機構はいくつかあるが<sup>8)</sup>、これに関連して、発生したCOを一時的にトラップする部位がHO中にあるのではないかと、あるとすればどこだろう？

この疑問に答えるため、我々は以下のように結晶解析法で取り組んだ。ここでは酵素反応でCOを発生させる代わりに、HO中のヘムにCOを結合させ（CO-heme-HO）、これにレーザー光を照射してCOを解離させることにした。CO-heme-HO結晶を回折計にマウントし、低温（ $\sim 35K$ ）で、まず薄暗くして回折データを収集した。次に、この結晶にレーザー光を照射しながら、他は全く同じ条件で回折データを収集した。これら2セットのデータ間の差（ $F_{\text{illuminated}} - F_{\text{dark}}$ ）を係数にした電子密度を図3Bに示す。予想通り、ヘム鉄に結合していたCOの箇所は、レーザー光照射によって電子密度が減少し、ヘムから少し離れた箇所でも電子密度が高くなった。このうちsite-2は疎水性のアミノ酸側鎖に囲まれたキャビティーであった。この結果から、光解離したCO（の一部）はこの部位にトラップされたといえる。電子密度の高さから、この実験条件では約10%のCOがヘム鉄から解離し、その約半分がこの部位にトラップされたと見積もられた。単一の結晶を用いて、レーザー光照射の有無以外

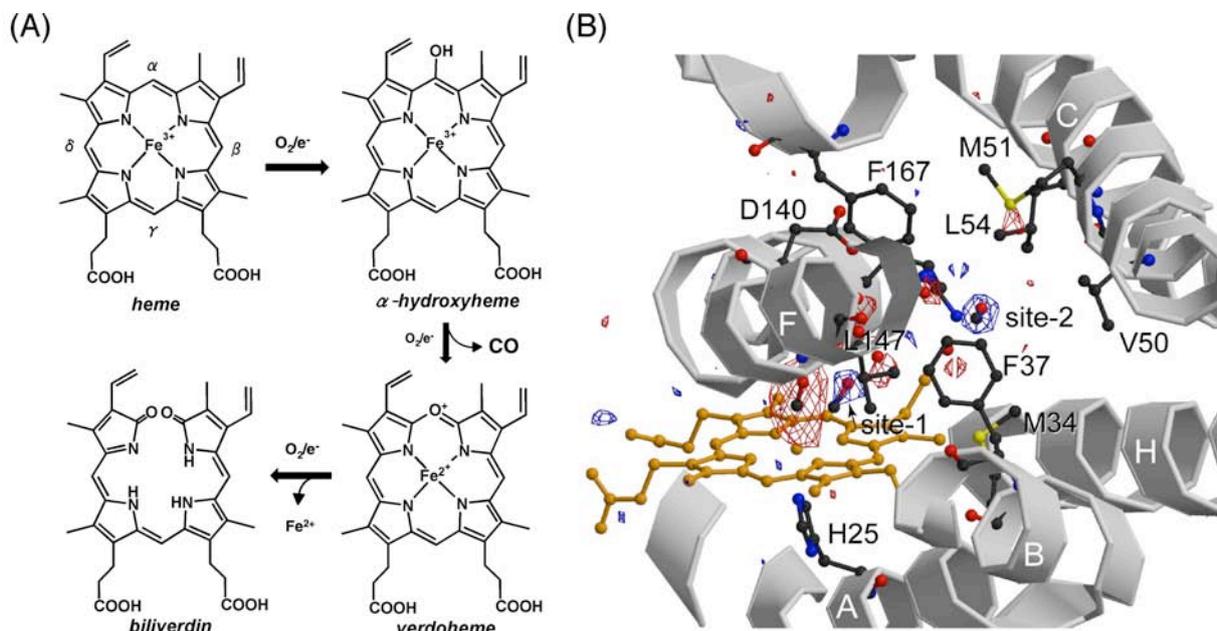


図3. HOが触媒する反応とCOの行方

(A) HOの3段階反応。HOは各段階で一分子の $O_2$ を用い、2段階目でCOが生成する。(B) CO-heme-HO結晶の暗所とレーザー光照射の差の電子密度。レーザー光照射により減少した電子密度を赤で、増加した電子密度を青で示す。Bは生化学 77, 634-638 (2005)より許可を得て転載。

は全く同じ条件で測定した（電子密度のノイズを下げた）ので、このようなわずかな電子密度変化（水素原子の電子密度の高さに相当）を検知できたといえよう。ちなみに、heme-HO結晶にXeガスを充満させ加圧した後急速凍結させると、同じ部位にXeに由来する電子密度が明瞭に見える。なお、COの代わりにCNを使った同様の実験では注目している部位に電子密度はみえなかったことから、この部位はイオンをトラップしないといえよう。これらの結果から、酵素反応で生じるCOもこの部位に一時的にトラップされ、これによってCOが幾らかでもヘム鉄に結合することを防いでいると考えている。

## 6. おわりに

X線結晶解析法が生来もつ制約（結晶でなければならぬ）の中で、不安定な分子の構造をみた例を幾つか紹介した。これらの例からわかるように、このような制約にどう対応するか、すなわち立体的に均一な分子が規則正しく配列した結晶をどう調製するかがキーポイントである。現在のX線解析技術で、結晶中の分子を同期させて同じように構造変化を起こすことができれば、ミリ秒オーダーの反応でも各ステップを捉えることができる。タンパク質分子の種類にかかわらず、適切な試料（結晶）が準備できたかどうか成否を分け、これをクリアーした場合にはこの方法からきわめて重要かつ豊富な情報が得られる。

## 参考文献

1. Shimomura, Y., Kamikubo, H., Nishi, Y., Masako, T., Kataoka, M., Kobayashi, Y., Fukuyama, K., and Takahashi, Y. (2007) Characterization and crystallization of an IscU-type scaffold protein with bound [2Fe-2S] cluster from the hyperthermophile, *Aquifex aeolicus*, *J. Biochem.* 142, 577-586.
2. Shimomura, Y., Wada, K., Fukuyama, K., and Takahashi, Y. (2008) The asymmetric trimeric architecture of [2Fe-2S] IscU: Implication for its scaffolding during iron-sulfur cluster biosynthesis, *J. Mol. Biol.* 383, 133-143.
3. Tokumoto, U., Kitamura, S., Fukuyama, K., and Takahashi, Y. (2004). Interchangeability and distinct properties of bacterial Fe-S cluster assembly systems: Functional replacement of the *isc* and *suf* operons in *Escherichia coli* with the *nifSU*-like operon from *Helicobacter pylori*, *J. Biochem.* 136, 199-209.
4. Okada, T., Suzuki, H., Wada, K., Kumagai, H., and Fukuyama, K. (2006) Crystal structures of  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase from *Escherichia coli*, a key enzyme involved in glutathione metabolism, and its reaction intermediate, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 6471-6476.
5. 鈴木秀之, 和田啓, 福山恵一 (2009)  $\gamma$ -グルタミルトランスペプチダーゼの立体構造に基づいた成熟化と酵素反応機構, *蛋白質核酸酵素* 54, 245-251.
6. Sugishima, M., Sakamoto, H., Noguchi, M., and Fukuyama, K. (2004) CO-trapping site in heme oxygenase revealed by photolysis of its CO-bound heme complex: Mechanism of escaping from product inhibition, *J. Mol. Biol.* 341, 7-13.
7. 杉島正一 (2007) ヘムの代謝にかかわる酵素の構造生物学, *日本結晶学会誌* 49, 99-106.
8. Sugishima, M., Sakamoto, H., Noguchi, M., and Fukuyama, K. (2003) Crystal structures of ferrous and CO-, CN-, and NO-bound forms of rat heme oxygenase-1 (HO-1) in complex with heme: Structural implications for discrimination between CO and O<sub>2</sub> in HO-1, *Biochemistry* 42, 9898-9905.

## タンパク質相互作用を見る

東京大学・大学院総合文化研究科

栗栖源耐\*

### 1. はじめに

タンパク質の構造と機能の相関を研究する上でタンパク質の立体構造は、“分子がどのようにして機能しているか?”という疑問に対して多くの情報を与えてくれる。筆者がこの分野で研究を開始した17年前と比較してX線結晶構造解析法の技術的な進歩は目覚しく、現在データベース上に登録されているタンパク質の立体構造は50,000件を優に超える。結晶化・構造解析した情報を基に、部位特異的変異の導入や化学修飾を施して、タンパク質分子の相互作用部位を同定することは非常に一般化したと言えよう。このような研究の延長線上で、タンパク質が機能している複合体状態で構造解析し、もっと直接的に「タンパク質の相互作用を見よう」という試みがなされている。X線結晶構造解析法は複数の構成成分を含む複合体状態でも、単結晶にすることさえできれば構造解析することが可能であり、実際に複合体結晶構造からは複合体形成により誘発される構造変化やタンパク質分子間の相対配置など、単体タンパク質の立体構造からは計り知れない新たな構造情報を得ることができる。データベースに登録されている実際の複合体構造解析例は少ないものの、今後の構造生物学研究の目指す方向性の一つであることは間違いない。本稿では、これまでに研究対象とされたタンパク質-タンパク質複合体を例に複合体結晶の調製方法の概略と得られる具体的な構造情報について紹介する。

### 2. 複合体状態でのタンパク質結晶化の特徴

タンパク質複合体には、相互作用が非常に強く、特定の相手とだけ強く相互作用する場合と、相互作用は弱いのだが解離会合を繰り返しながら複数の相手と複合体を形成する場合とが存在する。試料調整の方法で見ると、片方のタンパク質にだけタグを導入するだけで、複合体試料として調製できる場合と、それぞれ別に精製したサンプルをモル比で等量混合し、複合

体試料とする場合とがある。勿論、十分なタンパク質量を確保する必要があるため、調整法と精製度に制限がかかるケースも多い。結晶化実験は沢山の条件検索を行う為、十分量のタンパク質を用意することが第一条件となろう。

結晶構造解析を専門としない研究者の中には、時折「タンパク質の結晶化条件はタンパク質と一対一で対応している」と勘違いされている方がおられる。実際には、あるタンパク質が硫酸アンモニウムで結晶化するからと言って、そのタンパク質を含むタンパク質複合体が硫酸アンモニウムで結晶化するとは限らない。複合体の結晶化実験には一からの条件検索が必須なのである。タンパク質複合体を形成する主な相互作用として、「疎水性相互作用」「静電相互作用」「ファンデアワールス相互作用」などが挙げられる。結晶化実験を始める前に実験対象とするタンパク質複合体が主にどのような相互作用により形成されているかを生化学的に確認しておくことは、結晶構造解析を進める上で大変重要である。タンパク質複合体の結晶化実験も通常タンパク質の結晶化実験と同じように、硫酸アンモニウムやポリエチレングリコール (PEG) 等の結晶化用試薬を使う。その為、複合体の形成様式によっては使用する結晶化試薬に制約が生じるからである。個々の結晶化条件は非常に個別的で、タンパク質複合体の結晶化に特別な傾向は見出せないが、一般に静電的な相互作用により複合体が安定化される場合は、硫酸アンモニウムなどの塩を使わずにPEGを沈殿剤して複合体結晶が調製される事が多い。一方、分子間相互作用の大部分が疎水的相互作用の場合は、リン酸塩や硫酸塩などの塩類が沈殿剤として用いられている。

それでは、次に、実際のタンパク質複合体の結晶化例を見ていきたいと思う。本稿では、特定の相手とだけ強く結合するタイプの複合体として、1) ビタミンB<sub>12</sub>輸送体と細胞毒素のレセプター結合ドメインの構造について、そして解離会合を繰り返しながら複数の

\* 連絡先 E-mail: gkurisu@xtal.c.u-tokyo.ac.jp

相手と複合体を形成するタイプの代表として、2) 電子伝達タンパク質フェレドキシン (Fd) と Fd 依存性酵素との複合体形成について構造研究の概要をご紹介します。

### 3. 特定の相手とだけ強く結合するタイプの複合体

コリシンE3はバクテリオシンと呼ばれる551残基からなる抗菌性タンパク質で、大腸菌の2つの膜レセプターを利用することにより菌内に入り込み、rRNAを特異的に加水分解し大腸菌を殺す活性を持っている。その構造は膜透過の為のT-ドメインとレセプター結合の為のR-ドメイン、そして RNAase 活性を持つC-ドメインの3ドメインから構成されている。遺伝学実験により、大腸菌外膜に存在するビタミンB<sub>12</sub>レセプター (BtuB : 594残基) とチャンネルタンパク質 OmpF (340残基) を介して膜内に入り込むことは判っていたが、レセプターはそれぞれ分子量1,300および600程度の小分子を輸送するタンパク質であり、分子量6万を超えるコリシンE3がどのようにして大腸菌の外膜を通り抜けていくかは不明のままであった。そこで、筆者は米国 Purdue 大学の W. A. Cramer 教授グループにおいて、135残基からなるコリシンE3のレセプター結合ドメインとBtuBの複合体を 2.75 Å 分解能で構造解析した<sup>2)</sup>。

**結晶化と構造解析** 実験に用いたコリシンE3のレセプター結合ドメイン (R135) とBtuBは、それぞれ別は大腸菌により大量発現させてHisタグにより精製した。BtuBは膜タンパク質であるため、結晶化用のサンプルはすべて界面活性剤の存在下で調製した。結晶化用の複合体はタンパク質を一定の割合

(R135:BtuB=1.25:1) で混合した後に、サンプルを濃縮することにより得た。結晶化には異なった界面活性剤を用いることにより異なった結晶系の結晶が得られたが、最終的に構造解析可能であったのはLDAOを界面活性剤に用いた結晶であった。構造解析は単体のBtuBの構造をサーチモデルにした分子置換法で行い、解析の初期段階の差フーリエ上にR135に対応する電子密度が得られた。最終的にR135と分子BtuBが1対1で結合した複合体を 2.75 Å 分解能で精密化した。

**構造と機能** 得られた複合体の構造は予想以上に興味深いものであった。BtuBは22本のβストランドからなるβバレル構造の中に130残基からなる“コルク”様ドメインが存在している。R135は、このコルクの構造を変えることなく先端のわずかなアミノ酸だけでBtuBと結合していた。結合は主にBtuBのループを介して行われ、R135のαヘリックスは膜面に対して、約40°斜めに傾いて結合していた。コリシンE3の全体構造を重ね合わせると、膜透過に必須のT-ドメインが膜側に配置しており、R135はT-ドメインを運ぶクレーンの役目を担っていることが推察された (図1)。コリシンE3のT-ドメインがOmpFチャンネルを塞ぐという電気生理データから、レセプター結合ドメインのBtuBへの傾いた結合がコリシンのT-ドメインを2番目のレセプターであるOmpFへと運ぶクレーンの役割を果たし、さらに複合体形成に誘発される形でT-ドメインのUnfoldingを引き起こして膜を通過する2レセプターメカニズムを提唱することができた。

### 3. 解離会合を繰り返しながら複数の相手と複合体を形成するタイプの複合体

フェレドキシン (Fd) は光化学系I複合体から電子を受け取り、解離会合を繰り返しながら炭素、窒素、硫黄の各代謝系へ光還元力を分配する電子伝達タンパク質である。改変体を用いた相互作用解析から、電子を受け取る側の Fd 依存性酵素群は、各々 Fd の異なったアミノ酸残基を認識していることが判っている。電子伝達複合体の形成が光還元力の分配機構と密接に係わっていると考えており、筆者は大阪大学の長谷俊治教授の研究グループと共同で電子伝達複合体の構造研究を進めてきた。Fdと相手タンパク質はソフトな相互作用を基に複合体を形成するが、我々はX線結晶解析の手法を用いて複数の複合体を構造解析し、Fdの持つ複合体形成様式の詳細を明らかにした<sup>3,4)</sup>。

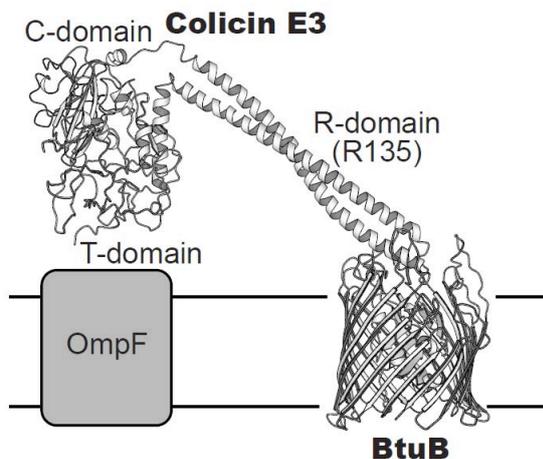


図1. R135とBtuBの複合体結晶構造を基に作図したコリシンE3とBtuBの結合状態

**結晶化と構造解析** 実験に用いたトウモロコシFdとFNRの試料は大腸菌による大量発現系により得られた<sup>5)</sup>。結晶化に用いたFdとFNRとの複合体は3種類の方法により調製した。まず、ゲルろ過クロマトグラフィーにより複合体を精製する方法。次にFdを過剰に加えた混合溶液を分画分子量30 Kの膜を用いて濃縮、希釈を繰り返す事により、過剰量加えた分子量12 KのFdを素通りさせる方法(複合体の分子量は約47 K)、そして最後に等モルになるよう濃度計算し単純に混合させる方法である。結果的にどの方法で調製した複合体でも同じような結晶を得ることが出来た。Fdを中心とした電子伝達反応系では全ての Fd 依存性酵素で静電的な相互作用によりタンパク質・タンパク質複合体を形成する。このことは分子表面の電荷をもった残基を中性の残基に置換した改変体が電子伝達複合体を形成しないことによって確認されている<sup>6)</sup>。したがって、色々な平均分子量のPEG溶液を沈殿剤に選択し、結晶化条件の検索を進めたところ、100 mM NaClを含む20%(w/v) PEG4000を沈殿剤とした時に薄茶色の結晶を得た。Fdは[2Fe-2S]クラスターを有する濃い赤色を、一方のFNRはフラビン酵素であるため鮮やかな黄色をした酵素である。得られた結晶は薄茶色を呈しており、2種類のタンパク質の混合物であることは明白であった。分子置換法による構造解析を進めたところ、解析の初期段階で差フーリエ上にFdに対応する電子密度を確認できた。最終的にFdとFNRの両方の座標を精密化していき、2.59 Å分解能での立体構造を決定した。

2.59 Å分解能で得られた電子伝達タンパク質複合体の立体構造を図2に示す。この複合体構造中ではFNRの酸化還元中心であるFADと、Fdの酸化還元中心である[2Fe-2S]クラスターの最短距離は4.1 Åであった。さらに酸化還元中心近傍に疎水的な状況を作り出して、補欠分子族間での直接電子伝達に適した環境となっていた。この疎水的な領域を取り囲む形で、21残基の電荷を持ったアミノ酸が存在していた。このうち5対のアミノ酸が分子間に塩橋を形成して複合体を安定化し、FdとFNRの相対的立体配置決定の主要因になっていた。FdとFNR間の静電的相互作用に関して、生化学実験からその重要性が指摘されていたアミノ酸残基は、すべて複合体構造中の会合領域に位置していた。しかしながら、今回新しく見出されたFdのArg 40とFNRのGlu 154による塩橋の形成は、全く予想され

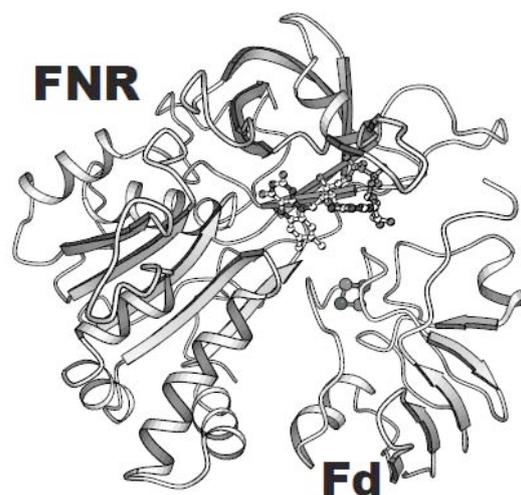


図2. FdとFNRの複合体構造

ていないものであった。複合体を形成していない単体状態のFdではArg 40の側鎖がGlu 29の側鎖と分子内に塩橋を形成し、[2Fe-2S]クラスターを取り囲んでいるループ構造を安定化している。今回の複合体構造中ではArg 40とGlu 29の分子内塩橋が開裂し、FNRのGlu 29およびLys 304と新たに分子間に塩橋を形成していた。現在のところ、FNRとの複合体形成に伴う塩橋の架け替えが、Fdの持つ[2Fe-2S]クラスターの酸化還元電位をさらに約90 mV低下させるという従来の報告に対応する構造変化であると考えている<sup>7)</sup>。次にFdが結合していない単体FNRの立体構造と複合体FNRの立体構造を比較したところ、興味深い構造変化を確認することが出来た。FNRのGlu 312はFAD近傍に存在する保存残基で活性中心に位置している。また、このGlu 312の側鎖はFNR内部にあるSer 96と共にNADP(H)のニコチン環と水素結合することが報告されている<sup>8)</sup>。フリー状態のFNRではGlu 312はSer 96と離れているが、複合体になることによりSer 96の方へ約2 Å近づいて水素結合可能な距離に移動していた。Glu 312側鎖は、結合したFdと立体障害を起こすことにより分子内部へと押し込まれた形になっていたのである。これは複合体形成によりFNRの活性残基がNADP(H)と特定の相互作用をする為に必要な配置へと構造変化したと考えられる。

#### 4. 今後の課題と展開

具体例として紹介させていただいた複合体状態のビタミンB<sub>12</sub>輸送体と電子伝達複合体の両構造とも、X線構造解析以外の物理化学的手法による相補的な複合体解析が行われている。前者のビタミンB<sub>12</sub>輸送体の場合、CDスペクトルを測定して、複合体形成によりR135の $\alpha$ ヘリックス含量が約14%減少し、コリシンE3

にUnfoldingを伴う構造変化が起きている事を示唆するデータが得られている<sup>2)</sup>。また、後者の電子伝達複合体の場合、<sup>15</sup>NでラベルしたFdの化学シフトを同定し、FNRを滴定した時の化学シフトの変化からNMRでもX線でもほぼ同じアミノ酸を使って複合体を形成していることを確認している<sup>4)</sup>。このように、タンパク質複合体の構造解析と、種々の物理化学的手法を相補的に併用することにより、より信頼度の高い情報を得る努力が必要であろう。今後、光合成研究をはじめ特定のテーマ毎に的を絞ったタンパク質複合体のデータが蓄積し、高次の生命現象を複合体分子構造ベースで議論される事を希望してやまない。

### 参考文献

1. Soelaiman, S., Jakes, K., Wu, N., Li, C. and Shoham, M. (2001) Crystal structure of colicin E3: implications for cell entry and ribosome inactivation, *Mol. Cell* 8, 1053-1062.
2. Kurisu, G., Zakharov, S.D., Zhahnina, M.V., Bano, S., Eroukova, V.Y., Rokitskaya, T.I., Antonenko, Y.N., Wiener, M.C. and Cramer, W.A. (2003) The structure of BtuB with bound colicin E3 R-domain implies a translocon, *Nat. Struct. Biol.* 10, 948-954.
3. Kurisu, G., Kusunoki, M., Katoh, E., Yamazaki, T., Teshima, K., Onda, Y., Kimata-Arigo, Y. and Hase, T. (2001) Structure of the electron transfer complex between ferredoxin and ferredoxin-NADP(+) reductase, *Nat. Struct. Biol.* 8, 117-121.
4. Hanke, G. T., Kurisu, G., Kusunoki, M., and Hase, T. (2004) Fd:FNR electron transfer complexes: Evolutionary refinement of structural interactions, *Photosyn. Res.* 81, 317-327.
5. Hase, T., Kimata, Y., Yonekura, K., Matsumura, T. and Sakakibara, H. (1991) Molecular cloning and differential expression of the Maize ferredoxin gene family, *Plant Physiol.* 96, 77-83.
6. Akashi, T., Matsumura, T., Ideguchi, T., Iwakiri, K., Kawakatsu, T., Taniguchi, I. and Hase, T. (1999) Comparison of the electrostatic binding sites on the surface of ferredoxin for two ferredoxin-dependent enzymes, ferredoxin-NADP(+) reductase and sulfite reductase, *J. Biol. Chem.* 274, 29399-29405.
7. Batic, C.J. and Kamin, H. (1981) The relation of pH and oxidation-reduction potential to the association state of the ferredoxin . ferredoxin:NADP+ reductase complex, *J. Biol. Chem.* 256, 7756-7763.
8. Deng, Z., Aliverti, A., Zanetti, G., Arakaki, A.K., Ottado, J., Orellano, E.G., Calcaterra, N.B., Ceccarelli, E.A., Carrillo, N. and Karplus, P.A. (1999) A productive NADP+ binding mode of ferredoxin-NADP + reductase revealed by protein engineering and crystallographic studies, *Nat. Struct. Biol.* 6, 847-853.

## 集会案内

### 学術創成研究合同シンポジウムのご案内

2009年7月10日午後～11日午前、京都大学におきまして日本光合成研究会の協賛で学術創成研究の合同シンポジウムを行います。これは、現在進行中の三室守、鹿内利治、高橋裕一郎の三つの学術創成研究の成果を積極的に公開することを目指すもので、数名のゲストスピーカーを加えて、最近の光合成研究の進展について議論したいと思っております。場所は、10日は時計台記念館大ホール、11日は国際交流大ホールです。多数の会員の皆様の参加をお待ちしております。詳細が決まり次第、電子メール、ホームページによりお知らせいたします。なお、本シンポジウムに引き続き、11日午後～12日に光合成の色素系と反応中心に関するセミナーXVIIが開催されます。

問い合わせ先：三室守 mamami@mm1.mbox.media.kyoto-u.ac.jp

### 光合成の色素系と反応中心に関するセミナーXVII 開催予告

期日 平成21年7月11日（土）午後4時から7月12日（日）午後4時まで

場所 京都大学 人間・環境学研究科 地下講義室 (23A、23B 室)

開催の目的：

光合成の光反応系に関して、物理学、化学、生物学を融合した討論を行う。また、光合成生物、光化学反応系の進化に関する事項についても討論する。

内容：

1. 初習者のための基礎講座（講義）
2. ポスター発表（図1枚を使い、3分間以内で要旨の説明を行う）
3. 口頭発表（討論を含めて一人15分を予定）

平成21年7月10日午後（金）、11日午前（土）に予定されている「学術創成 研究合同シンポジウム」（三室、鹿内、高橋の3つのプロジェクトの合同シンポジウム）（京大構内にて開催）に引き続いて開催の予定です。基礎講座は例年に比べて縮小し、ポスター討論、口頭発表に重点を置く予定です。

申込：

発表申し込み締め切り（予定） 平成21年7月3日（金）

参加申し込み締め切り（予定） 平成21年7月7日（火）

参加費：（7月11日の懇親会費、7月12日の昼食代を含む）

一般 5,000円（予定）

学生 3,000円（予定）

問い合わせ先：

今後の案内の配布を希望される方は京都大学大学院地球環境学堂、三室まで お知らせ下さい。案内は総て電子メールにて配布します。

(e-mail address: mamami@mm1.mbox.media.kyoto-u.ac.jp)

## 新刊図書

### **Photosynthesis *in silico***

#### **Understanding Complexity from Molecules to Ecosystems**

##### **Series: Advances in Photosynthesis and Respiration, Vol. 29**

Laisk, Agu; Nedbal, Ladislav; Govindjee (Eds.)

Springer 2009, Approx. 520 p., Hardcover

ISBN: 978-1-4020-9236-7

<http://www.springer.com/life+sci/plant+sciences/book/978-1-4020-9236-7>

### **Primary Processes of Photosynthesis**

#### **Principles and Apparatus**

##### **Series: Comprehensive Series in Photochemical & Photobiological Sciences, Vol. 8**

Renger, Gernot (Ed.)

Royal Society of Chemistry 2008, 1088 p. In 2 volumes, not available separately., Hardcover

ISBN: 978-0-85404-364-4

<http://www.rsc.org/shop/books/2007/9780854043644.asp>

### **Tetrapyrroles**

#### **Birth, Life and Death**

##### **Series: Molecular Biology Intelligence Unit**

Warren, Martin J.; Smith, Alison G. (Eds.)

Springer 2009, XX, 406 p. 157 illus., 2 in color., Hardcover

ISBN: 978-0-387-78517-2

<http://www.springer.com/life+sci/plant+sciences/book/978-0-387-78517-2>

### **Phenology of Ecosystem Processes**

#### **Applications in Global Change Research**

Noormets, Asko (Ed.)

Springer 2009, Approx. 315 p. 83 illus., Hardcover

ISBN: 978-1-4419-0025-8

<http://www.springer.com/environment/global+change+-+climate+change/book/>

978-1-4419-0025-8

## 新刊図書

## 「光合成研究法」出版のご案内

1981年に光合成研究会が中心となり「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。この本は残念ながら絶版となりましたが、今でも多くの方に利用されています。しかし、光合成をめぐるその後の発展は目覚しく、新しい手法も多く取り入れられました。また、この間、植物科学の分野だけでなく、地球環境や工学など多くの研究者が光合成に興味を持つようになりました。これらを背景に、光合成研究会の幹事会を中心に議論を重ね、多くの会員の協力を得ながら、新しい「光合成研究法」の出版に至りました。684ページの総カラー版で、美しく仕上がっています。項目も、材料の入手から、バイオフィオマティクスに至るまで、広く取り扱っています。この本は、一般販売しませんが、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。また、日本光合成研究会の会員の方には、5月の連休明けに冊子をお届けする予定です。これを機会に、多くの方に、日本光合成研究会を紹介していただければ幸いです。



「光合成研究法」の内容については、次項からの目次をご覧ください。2009年度の日本光合成研究会会員で本書を希望される方には、「光合成研究法」を配布予定です。（無料または送料のみ負担）

「光合成研究法」はウェブページでも公開されています。一括でダウンロードする（サイズは16.7 Mb）か、項目ごとにダウンロードすることが出来ます。それぞれのサイトは以下の通りです。

一括ダウンロード：<http://www.lowtem.hokudai.ac.jp/LTS/index.html>

項目ごとダウンロード：<http://eprints.lib.hokudai.ac.jp/bulletin/lowtemp/>

# 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, 久保内雄昭	17
1-4	ゼニゴケの培養法	大和勝幸, 石崎公庸, 河杉内孝	23
1-5	ヒメツリガネゴケ	青木摂之, 鹿内利護	31
1-6	シロイヌナズナを用いた光合成研究	山本義治, 小保方内利	35
1-7	タバコ	山本義治, 小保方内利	39
1-8	イネ	稲垣言志	43
1-9	藻類	村上明男, 小椋山要	53
1-10	紅藻の培養, 入手	榎並	61
1-11	珪藻の培養, 入手	榎並	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 <sub>2</sub> 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 <sub>2</sub> 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	ガスチャンパー法 (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	原田二郎, 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 <sup>+</sup> 還元酵素の調製と生化学的解析	榎原由紀子, 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	柴田勝造	233
3-3-f	光化学系 I 反応中心の鉄-硫黄クラスター	岡宏	245
3-3-g	CF <sub>0</sub> CF <sub>1</sub> , 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	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, 川純	381
3-6-d-2	シヨ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	小澤真一郎, 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, 野次郎	423
4	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	伊藤三野	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, 遠藤賢剛	539
4-4	酸化還元滴定	永島賢建	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	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, 香村吉利	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, 野次郎	649
6	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	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

## 事務局からのお知らせ

### ★日本光合成研究会新役員のお知らせ

平成21年1月付けで、池内昌彦（東京大学）新会長の下、新たな常任幹事として、沈建仁（岡山大学）、佐藤直樹（東京大学）、和田元（東京大学）、寺島一郎（東京大学）、増田建（東京大学）が就任しました。

### ★入会案内

本会へ入会を希望される方は、会費（個人会員年会費：¥1,500、賛助法人会員年会費：¥50,000）を郵便振替（加入者名：日本光合成研究会、口座番号：00140-3-730290）にて送金の上、次ページの申し込み用紙、または電子メールにて、氏名、所属、住所、電話番号、ファックス番号、電子メールアドレス、入会希望年を事務局までお知らせください。

### ★会費納入のお願い

光合成研究会は会員の皆様からの会費1,500円により成り立っております。しかし、残念ながら会費の滞納が多い状態が続いております。原因の一つは、皆様のご自身の会費納入状況を把握しにくいシステムにあったかと思えます。光合成研究会の会費徴収を適正化するために、いくつかのお願いがございます。まず、**2003年以前の会費納入の義務を免除すること**をお認めください。滞納年がとびとびの方がおられて、事務局での管理が困難なためです。ご本人も未納の記憶がないと思われれます。さらに今後は、**5年の会費滞納者には個別に会費納入のお願い**を差し上げます。**お支払いいただけない場合は、次年度は退会**とさせていただきます、自動的に5年以上の滞納者はおられなくなります。また5年未満の滞納年のある方には、会誌送付時に封筒に会費未納の判が押してあり、未納年が記されております。また、**未納年がある場合、納められた会費は、最も古い未納年に充当**させていただきます。納入状況が虫食いになることを避けるためです。会費納入状況などにつきましては、ご遠慮なく事務局（shikanai@pmg.bot.kyoto-u.ac.jp）までお問い合わせください。会員の皆様のご理解とご協力をお願い申し上げます。

## 記事募集

日本光合成研究会では、会誌に掲載する記事を会員の皆様より募集しています。募集する記事の項目は以下の通りです。

- トピックス：光合成及び関連分野での纏まりのよいトピックス的な記事。
- 解説：光合成に関連するテーマでの解説記事。
- 研究紹介：最近の研究結果の紹介。特に、若手、博士研究員の方々からの投稿を期待しています。
- 集会案内：研究会、セミナー等の案内。
- 求人：博士研究員、専門技術員等の募集記事。
- 新刊図書：光合成関係、または会員が執筆・編集した新刊図書の紹介。書評も歓迎いたします。

記事の掲載を希望される方は、会誌編集担当、増田（ctmasuda@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）まで御連絡下さい。

## 日本光合成研究会会員入会申込書

平成 年 月 日

日本光合成研究会御中

私は日本光合成研究会の趣旨に賛同し、平成 年より会員として入会を申し込みます。

]内に会員名簿上での公開承諾項目に○印をつけてください

] 氏名（漢字）（必須）

氏名（ひらがな）

氏名（ローマ字）

] 所属

] 住所1

〒

] 住所2（自宅の方または会誌送付先が所属と異なる場合にのみ記入）

〒

] TEL1

] TEL2（必要な方のみ記入）

] FAX

] E-mail

個人会員年会費 1,500円（会誌、研究会、ワークショップなどの案内を含む）

賛助法人会員年会費 50,000円（上記と会誌への広告料を含む）

（振込予定日：平成 年 月 日）（会員資格は1月1日～12月31日を単位とします）

\*複数年分の会費を先払いで振り込むことも可能です。その場合、通信欄に（何年度～何年度分）とお書き下さい。

### 連絡先

〒153-8902 東京都目黒区駒場3-8-1

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

池内・成川研究室内 日本光合成研究会

TEL: 03-5454-6641, FAX: 03-5454-4337

E-mail: photosyn@bio.c.u-tokyo.ac.jp

ホームページ: <http://photosyn.c.u-tokyo.ac.jp>

郵便振替口座 加入者名：日本光合成研究会 口座番号：00140-3-730290

## 日本光合成研究会会則

### 第1条 名称

本会は日本光合成研究会（The Japanese Association for Photosynthesis Research）と称する。

### 第2条 目的

本会は光合成の基礎および応用分野の研究発展を促進し、研究者相互の交流を深めることを目的とする。

### 第3条 事業

本会は前条の目的を達成するために、シンポジウム開催などの事業を行う。

### 第4条 会員

#### 1. 定義

本会の目的に賛同する個人は、登録手続を経て会員になることができる。また、団体、機関は、賛助会員になることができる。

#### 2. 権利

会員および賛助会員は、本会の通信および刊行物の配布を受けること、本会の主催する行事に参加することができる。会員は、会長を選挙すること、役員に選出されることことができる。

#### 3. 会費

会員および賛助会員は本会の定めた年会費を納めなければならない。

### 第5条 組織および運営

#### 1. 役員

本会の運営のため、役員として会長1名、事務局長1名、会計監査1名、常任幹事若干名をおく。役員任期は2年とする。会長、常任幹事は連続して二期を越えて再任されない。事務局長は五期を越えて再任されない。会計監査は再任されない。

#### 2. 幹事

幹事数名をおく。幹事任期は4年とする。幹事の再任は妨げない。

#### 3. 常任幹事会

常任幹事会は会長と常任幹事から構成され、会長がこれを招集し議長となる。常任幹事会は本会の運営に係わる事項を審議し、これを幹事会に提案する。事務局長と会計監査は、オブザーバーとして常任幹事会に出席することができる。

#### 4. 幹事会

幹事会は役員と幹事から構成され、会長がこれを招集し議長となる。幹事会は、常任幹事会が提案した本会の運営に係わる事項等を審議し、これを決定する。

#### 5. 事務局

事務局をおき、事務局長がこれを運営する。事務局は、本会の会計事務および名簿管理を行う。

#### 6. 役員および幹事の選出

会長は会員の直接選挙により会員から選出される。事務局長、会計監査、常任幹事は会長が幹事の中から指名し、委嘱する。幹事は常任幹事会によって推薦され、幹事会で決定され

る。会員は幹事を常任幹事会に推薦することができる。

#### 第6条 総会

1. 総会は会長が招集し、出席会員をもって構成する。議長は出席会員から選出される。
2. 幹事会は総会において次の事項を報告する。
  - 1) 前回の総会以後に幹事会で議決した事項
  - 2) 前年度の事業経過
  - 3) 当年度および来年度の事業計画
3. 幹事会は総会において次の事項を報告あるいは提案し、承認を受ける。
  - 1) 会計に係わる事項
  - 2) 会則の変更
  - 3) その他の重要事項

#### 第7条 会計

本会の会計年度は1月1日から12月31日までとする。当該年度の経理状況は、総会に報告され、その承認を受ける。経理は、会計監査によって監査される。本会の経費は、会費および寄付金による。

#### 付則

- 第1 年会費は個人会員1,500円、賛助会員一口50,000円とする。
- 第2 本会則は、平成14年6月1日から施行する。
- 第3 本会則施行後第一期の会長、事務局長、常任幹事にはそれぞれ、第5条に定める規定にかかわらず、平成14年5月31日現在の会長、事務局担当幹事、幹事が再任する。本会則施行後第一期の役員および幹事の任期は、平成14年12月31日までとする。

#### 日本光合成研究会の運営に関する申し合わせ

1. 幹事会：

幹事は光合成及びその関連分野の研究を行うグループの主催者である等、日本の光合成研究の発展に顕著な貢献をしている研究者とする。任期は4年とするが、原則として再任されるものとする。
2. 事務局：

事務局長の任期は2年とするが、本会の運営を円滑に行うため、約5期（10年）を目途に再任されることが望ましい。
3. 次期会長：

会長の引き継ぎを円滑に行うため、次期会長の選挙は任期の1年前に行う。
4. 常任幹事会：

常任幹事会の運営を円滑におこなうため、次期会長は常任幹事となる。

## 幹事会名簿

- 浅田浩二 福山大学生命工学部  
池内昌彦 東京大学大学院総合文化研究科  
池上 勇 帝京大学薬学部  
泉井 桂 近畿大学生物理工学部生物工学科  
伊藤 繁 名古屋大学大学院理学系研究科  
井上和仁 神奈川大学理学部  
白田秀明 帝京大学医学部  
榎並 勲 東京理科大学理学部  
大岡宏造 大阪大学大学院理学研究科  
大杉 立 東京大学大学院農学生命科学研究科  
太田啓之 東京工業大学  
バイオ研究基盤支援総合センター  
大政謙次 東京大学大学院農学生命科学研究科  
小川健一 岡山県生物科学総合研究所  
小野高明 茨城大学工学部生体分子機能工学科  
小侯達男 名古屋大学大学院生命農学研究科  
垣谷俊昭 名城大学理工学部教養教育/  
総合学術研究科  
金井龍二 埼玉大学 (名誉教授)  
坂本 亘 岡山大学資源生物科学研究所  
櫻井英博 早稲田大学 (名誉教授)  
佐藤和彦 兵庫県立大学大学院生命理学研究科  
佐藤公行 岡山大学 (名誉教授)  
佐藤直樹 東京大学大学院総合文化研究科  
佐藤文彦 京都大学大学院生命科学研究科  
鹿内利治 京都大学大学院理学研究科  
重岡 成 近畿大学農学部  
島崎研一郎 九州大学大学院理学研究院  
嶋田敬三 首都大学東京都市教養学部  
沈 建仁 岡山大学大学院自然科学研究科  
杉浦昌弘 名古屋市立大学  
大学院システム自然科学研究科  
杉田 護 名古屋大学遺伝子実験施設  
杉山達夫 中部大学生命健康科学研究所  
鈴木祥弘 神奈川大学理学部
- 園池公毅 東京大学大学院新領域創成科学研究科  
高市真一 日本医科大学生物学教室  
高橋裕一郎 岡山大学大学院自然科学研究科  
田中 歩 北海道大学低温科学研究所  
都筑幹夫 東京薬科大学生命科学部  
寺島一郎 東京大学大学院理学系研究科  
徳富(宮尾)光恵 農業生物資源研究所  
光合成研究チーム  
豊島喜則 関西学院大学理工学部  
南後 守 名古屋工業大学応用化学科  
西田生郎 埼玉大学大学院理工学研究科  
野口 巧 筑波大学大学院数理物質科学研究科  
長谷俊治 大阪大学蛋白質研究所  
林 秀則 愛媛大学  
無細胞生命科学工学研究センター  
原登志彦 北海道大学低温科学研究所  
彦坂幸毅 東北大学大学院生命科学研究科  
久堀 徹 東京工業大学資源化学研究所  
檜山哲夫 埼玉大学理学部 (名誉教授)  
福澤秀哉 京都大学大学院生命科学研究科  
藤田祐一 名古屋大学大学院生命農学研究科  
前 忠彦 東北大学大学院農学研究科  
牧野 周 東北大学大学院農学研究科  
増田 建 東京大学大学院総合文化研究科  
松浦克美 首都大学東京都市教養学部  
三室 守 京都大学大学院地球環境学堂  
宮地重遠 海洋バイオテクノロジー研究所  
村田紀夫 基礎生物学研究所  
山本 泰 岡山大学大学院自然科学研究科  
山谷知行 東北大学大学院農学研究科  
横田明穂 奈良先端科学技術大学院大学  
バイオサイエンス研究科  
和田 元 東京大学大学院総合文化研究科

**編集後記**

前任者の野口先生より引き継ぎ、今年より会誌編集を担当することになりました。池内会長の下、新体制になったのを機に、会誌の更なる充実を図っていきたいと考えています。一つの試みとして、もし会員の皆様からお認めいただければ、会誌の編集委員会を立ち上げたいと考えています。光合成に関連する、より広い分野からの記事の収集を図るとともに、若手の研究者や大学院生の記事に編集委員がピアレビューを行うことで、若手の論文執筆訓練の登竜門として会誌が機能するとともに、執筆者も査読付きの業績として生かすことができ、さらに内容のレベルアップが図れることを期待しています。会誌に関するご意見、ご要望などがありましたら、ctmasuda@mail.ecc.u-tokyo.ac.jpまでお寄せください。会員の皆様とともに、より良い会誌にしていきたいと考えております。さて新体制での第1号は、今年の植物学会シンポジウム「初歩から最新までのタンパク質の結晶構造解析」の演者を中心とした解説の特集や「光合成研究法」出版のお知らせなど、いきなり盛り沢山の内容になりました。お楽しみいただけたでしょうか？

＜東京大学 増田 建＞

\*\*\*\*\*

**日本光合成研究会 2008-2009年役員**

- |      |                     |            |
|------|---------------------|------------|
| 会長   | 池内昌彦 (東京大学)         |            |
| 事務局  | 鹿内利治 (京都大学)         |            |
| 常任幹事 | 沈 建仁 (岡山大学)         | (日本光生物学協会) |
| 常任幹事 | 和田 元 (東京大学)         | (会誌担当)     |
| 常任幹事 | 増田 建 (東京大学)         | (会誌担当)     |
| 常任幹事 | 佐藤直樹 (東京大学)         | (ホームページ担当) |
| 常任幹事 | 寺島一郎 (東京大学)         | (企画担当)     |
| 常任幹事 | 高市真一 (日本医科大学)       | (企画担当)     |
| 常任幹事 | 小川健一 (岡山県生物科学総合研究所) | (企画担当)     |
| 会計監査 | 小池裕幸 (中央大学)         |            |

\*\*\*\*\*

光合成研究 第19巻 第1号 (通巻54号) 2009年4月30日発行

**日本光合成研究会**

〒153-8902 東京都目黒区駒場3-8-1  
 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  
 池内・成川研究室 日本光合成研究会  
 TEL: 03-5454-6641, FAX: 03-5454-4337  
 E-mail: photosyn@bio.c.u-tokyo.ac.jp  
 ホームページ: <http://photosyn.c.u-tokyo.ac.jp>  
 郵便振替口座 加入者名: 日本光合成研究会 口座番号: 00140-3-730290