



Title	Blue-Native PAGE
Author(s)	菓子野, 康浩
Citation	低温科学, 67, 373-376 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
Issue Date	2009-03-31
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/39168
Type	bulletin (article)
Note	3章 単離・精製・活性測定 6. タンパク質 b
File Information	67-053.pdf



[Instructions for use](#)

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、6c 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、膜面

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、疎水の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 *Synechocystis* 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りに報告されている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、プロット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ば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はならないであろう。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、シヨ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、シヨ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- β -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 μ 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 μ g protein/ μ 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 μ g Chl相当量、光化学系II複合体は2 μ 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 0.02% Coomassie Blue G-250
Slightly Blue Cathode Buffer (pH 7.0)	50 mM Tricine, 7.5 mM Imidazole 0.002% Coomassie Blue G-250
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
5% CBB G-250	5% (w/v) Coomassie Blue G-250, 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られているので、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。6a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剥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、ゲル板を剥がす際に分離ゲルから剥がれてしまう。

未重合のアクリルアミドは高い神経毒性があるので、取り扱いには十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、パストールピ

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 μ L が適量である。分子量マーカー NativeMark は、スラブゲルの場合、5 μ L 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 μ L	30-50 μ L	25 μ L
TEMED	4.0-5.5 μ L	4.0-5.0 μ L	2.5 μ L

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. Schagger & G. von Jagow, *Anal Biochem* **199** (1991) P.223.
- 13) H. Schagger, in *Membrane Protein Purification and Crystallization: A Practical Guide*, ed C. Hunte, G. von Jagow, & H. Schagger (Academic Press, Amsterdam, 2002), P.105.
- 14) I. Wittig, H. P. Braun, & H. Schagger, *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. Granvogel, & L. A. Eichacker, *J Biol Chem* **279** (2004) P.48620.
- 18) D. Huang, R. M. Everly, R. H. Cheng, J. B. Heymann, H. Schagger, 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.