HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	嫌気条件下でのタンパク質精製
Author(s)	藤田, 祐一; 野亦, 次郎
Citation	低温科学, 67, 423-427 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/2115/39176
Type	bulletin (article)
Note	3章 単離・精製・活性測定 6. タンパク質 i
File Information	67-061.pdf

Instructions for use

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

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．

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

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

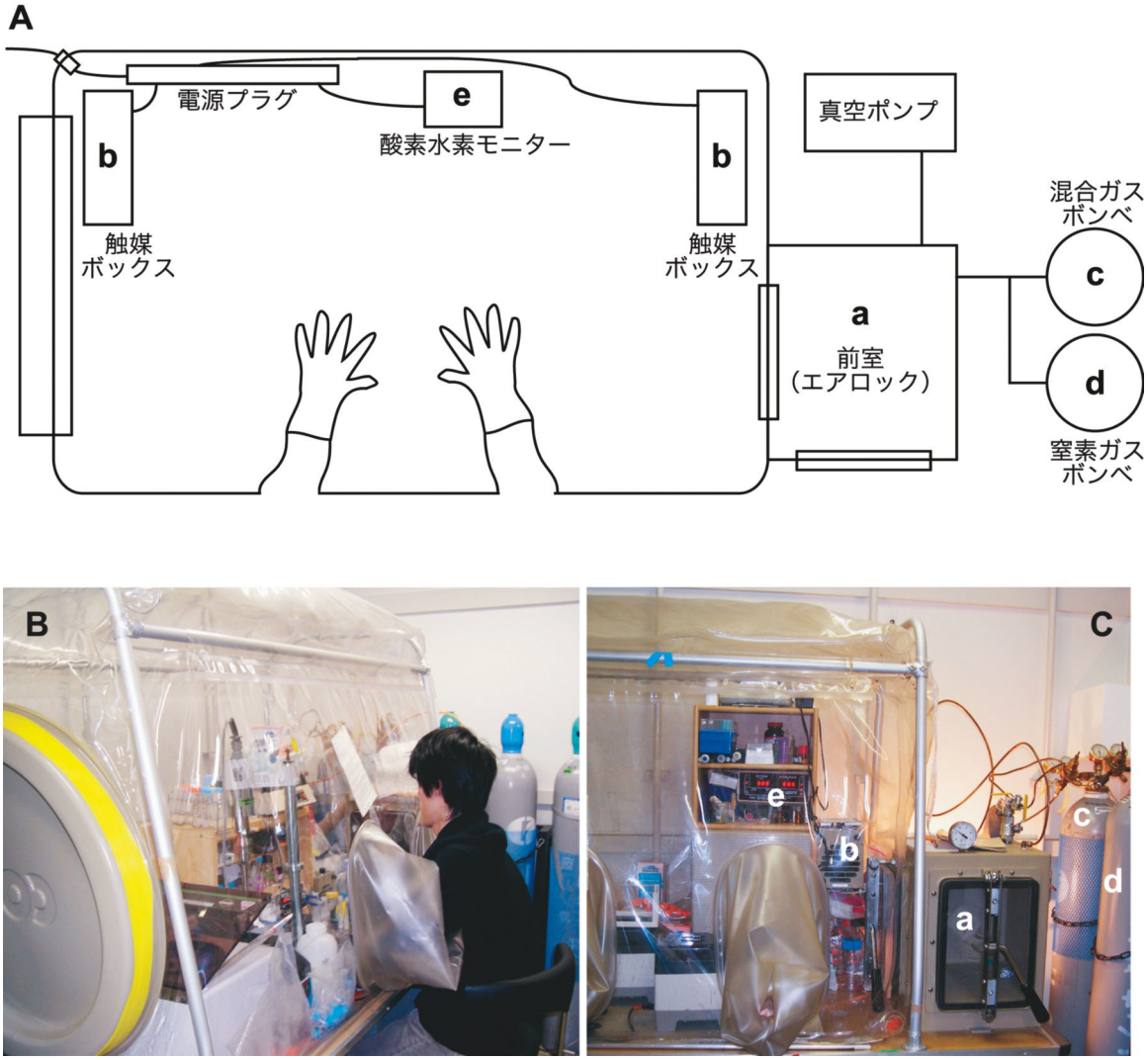

図1：嫌気チャンバー（A）嫌気チャンバーの構成図．（B）嫌気チャンバーで操作している著者．（C）前室付近．a～e の記号は，A と共通している．

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 β-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 μl）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.