



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	小型サブユニット
Author(s)	岩井, 雅子; 池内, 昌彦
Description	3章 単離・精製・活性測定 4. タンパク質複合体の単離 f
Relation	光合成研究法. 北海道大学低温科学研究所, 日本光合成研究会共編
Citation	低温科学, 67, 303-307
Issue Date	2009-03-31
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/39160
Type	departmental bulletin paper
File Information	67-045.pdf



4. タンパク質複合体の単離

f. 小型サブユニット

岩井 雅子¹⁾, 池内 昌彦²⁾

チラコイド膜に存在する光合成装置には多数の疎水性小型サブユニットが結合している。これらのタンパク質の分析法は一般のタンパク質実験法と異なるので、その分析法と問題点を概説する。

Low-molecular-mass subunits of photosynthetic apparatus

Masako Iwai, Masahiko Ikeuchi

Low-molecular-mass subunits are unique components of photosynthetic apparatus harboring photosystems and cytochrome b6/f complex in the thylakoid membranes. We summarized technical points for handling of these low-molecular-mass subunits including detailed protocol of SDS-urea-PAGE.

4.f.1 背景

光化学系IIや光化学系I複合体、シトクロム b_6/f 複合体には多数の小型サブユニットが結合している。これらのほとんどはチラコイド膜を貫通する α ヘリックスをもち、それぞれの反応中心を周辺から取り囲むように存在している。これらには進化的にシアノバクテリアから高等植物まで広く保存されているものが多い。その中には、複合体の会合や安定化、ステート移行や電子伝達など特定の役割が提唱されているものもあるが、近年の結晶構造解析の結果と合致しないものもある。これらの小型サブユニットの構造や機能、生理的役割についてはさらに詳しく調べる必要があるが、疎水性の低分子タンパク質に固有の技術的問題も多い。本項では、これらの小型サブユニットの分離・同定に使われる SDS-PAGE 法や抗体、アミノ酸配列の決定、質量分析法などさまざまな手法とその問題点について解説する。

4.f.2 SDS-urea-PAGE 法

SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (SDS-PAGE) はタンパク質の分離法としては非常に有効であり、なかでも濃縮ゲルをとり入れた Laemmli の方法¹⁾ は広く利用されている。一般に、低分子のタンパク質を分離するには、高濃度のアクリルアミドが適しているが、光合成系に存在する疎水性の分子質量 10 kDa 以下の小

型サブユニットを分離するには、それだけでは不十分である。そのおもな理由は、低分子の疎水性タンパク質が SDS と脂質の混合ミセルの泳動と競合すること、また脂質を除いてもそもそもシャープなバンドを形成できないことにある。この問題点を解決したのは筆者らの SDS-urea-PAGE 法²⁾ と Shägger らの Tris-Tricine 法³⁾ など特殊な電気泳動法である。これらは、3章6fで詳しく述べられているが、ここでは、筆者らの方法を、コツなどを交えて紹介する。

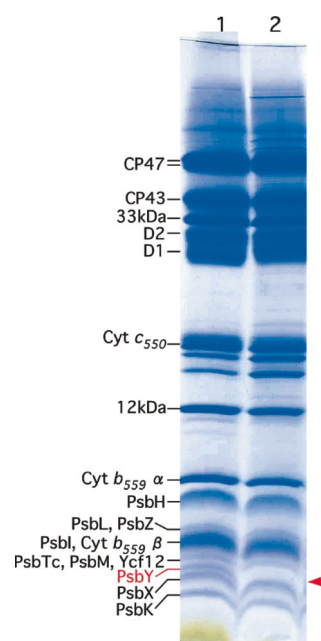


図1: SDS-urea-PAGE による光化学系II複合体の分離例。泳動先端部のクロロフィルを含む部分は SDS と脂質の混合ミセルに相当する。lane 1: *Thermosynechococcus elongatus* 野生株の系II, lane 2: 同 *psbY* 破壊株の系II。赤い矢印は、破壊によって消失した PsbY のバンド位置。

1) 東京理科大学理工学部応用生物科学科

2) 東京大学大学院総合文化研究科広域科学専攻生命環境科学系

SDS-urea-PAGE 法のポイントは、高濃度の尿素を用いることで、SDS と脂質の混合ミセルの移動度を大きくすること、またタンパク質に弱く結合した SDS を解離してくっきりとしたバンドとして分離することにある。また、この方法は Tris-Tricine 法と比べて、幅広い分子量のタンパク質を分離できることや安価な試薬だけでできる点ですぐれている。一方、室温が 20℃以下では尿素が析出するため泳動できないことは欠点である。

[実験方法]

準備

- 通常サイズのスラブ泳動用ガラス板 (16 cm×16 cm, スペース 1 mm) を用意する。
- 連通管型グラジエント作製器の両筒をつなぐチューブをスクリュウコックで閉じておく。
- ペリスタポンプ：流速を 1~1.5 mL min⁻¹ に設定しておく。
- 重合の予備実験が必要である。流速 1.5 mL sec⁻¹ の場合でも、18 mL を流し込むには、10 分以上要する。この間にアクリルアミドが重合しないように、しかも、30 分後には重合するように過硫酸アンモニウム溶液 (重合開始剤) と TEMED (重合促進剤) の量を調節する必要がある。これらをもめに入れるときは、重合開始剤などを加える前に、アクリルアミド混合液を氷上で 1 分ほど冷却して重合しにくくするとよい。

ゲル作製

1. 16-22%濃度勾配用の溶液を、表 1 に基づいて調製する。なお、過硫酸アンモニウムと TEMED 以外を混合して、少し暖めるなどして尿素を完全に溶解する。その後、すべての準備ができてから、過硫酸アンモニウムと TEMED を加え、よく混合する。
*筆者らは、50 mL 容量の大きいガラス試験管で混合液を調製している。尿素は周りから溶解熱を奪うため、高濃度の溶液をつくりにくい。必要に応じて、湯浴もしくは湯沸かし器のぬるま湯で少し暖める。しかし、溶液の温度が高くなると、グラジエント作製中にアクリルアミドが重合してしまうおそれがある。尿素の溶解後は、水道水に浸すなどして室温付近まで冷ます。これらの作業には試験管が便利であり、またボルテックスもできる。
2. グラジエント作製用連通管にこれらの溶液を入れる。重い 22%溶液を入れる側の管 (ペリスタポンプにつながれている側) には小さなマグネット (体積は約 0.5~1 mL) を入れ、スターラーで混合する。同様のマ

グネットを軽い側の管にも入れてもよい。

- *混合する 2 つの溶液の比重が大きくちがうので、等量の溶液を連通管に入れ、両管をつなぐチューブを開くと、重い側の液が軽い側へ逆に流れ込んでしまう。また、マグネットを重い側にだけ入れると、さらに逆流が促進される。この逆流を避けるコツは、2 つの溶液を入れた後、ペリスタポンプで約 1 mL ほど流した後で、両管をつなぐとよい。実際には、両管をつなぐ細いチューブをスクリュウコックなどで閉じておき、液を少し流してから、コックを開き、チューブ内の気泡を押し出すのが簡便である。軽い側の管の上部を手のひらで軽く押せば、チューブ内の気泡を押し出し、軽い側の液を重い側の管に流し込むことができ、その後の混合がスムーズに進む。
- 3. ペリスタポンプによってグラジエントを作製。流速約 1~1.5 mL min⁻¹。
- 4. 適当な位置で送液を止める (ガラス板の上端から約 2.6 cm くらいが目安)。
- 5. 水もしくはブタノールを重層して、空気を遮断する。
- 6. 室温で 1 時間以上放置して十分に重合させる。
- 7. 重層した水またはブタノールを除き、洗浄後、濃縮ゲル混合液を流し込み、手早くコウムを挿入する。
- 8. 30 min 以上放置して重合を完了。

保存溶液作製の注意

- 分離ゲルの pH が重要である。分離ゲル用緩衝液の調製では、3 M Tris 溶液に濃塩酸を加えて、pH を調整するが、このとき発熱する。Tris は緩衝液の中でもとくに pH の温度依存性が高い。したがって、濃塩酸を加

表 1:

	分離ゲル		濃縮ゲル
	16%	22%	
60%アクリルアミド溶液 A	2.4 mL	3.3 mL	—
60%アクリルアミド溶液 B	—	—	0.4 mL
分離ゲル用緩衝液	1.8 mL	1.8 mL	—
濃縮ゲル用緩衝液	—	—	0.4 mL
尿素	4.05 g	4.05 g	1.8 g
H ₂ O	1.8 mL	—	1.85 mL
60% (w/v) ショ糖	—	0.9 mL	—
10% (w/v) SDS	90 μL	90 μL	40 μL
10%過硫酸アンモニウム	30 μL	20 μL	28.5 μL
TEMED	4.3 μL	4.3 μL	4.5 μL

A: 60% (w/v) アクリルアミドモノマー, 0.8% (w/v) ビスアクリルアミド

A: 60% (w/v) アクリルアミドモノマー, 1.6% (w/v) ビスアクリルアミド

分離ゲル用緩衝液: 3 M Tris-HCl (pH 8.6)

濃縮ゲル用緩衝液: 1.26 M Tris-HCl (pH 6.8)

えて、見かけの pH が 8.6 になっても、しばらく放置して冷ますと、pH は 8.7~8.8 に上昇する。そのため、もう一度濃塩酸を加えて pH を調整する必要がある。なお、分離ゲル用緩衝液の pH が 8.8 以上では、低分子量域は広がるが、バンドはぼけて役に立たない。pH が 8.4 以下ではバンドはシャープになるが、低分子量域は圧縮されてしまうので、いい分離は期待できない。したがって、不満足な結果の場合は、分離ゲル用緩衝液の pH を再度確認した方がよい。

- ・アクリルアミド溶液：室温で遮光して保存する。濃度が高いので、4℃では沈澱を生じる。アクリルアミド溶液 A はビスの量が半分になっている。これは溶液 B でも代用できるが、分離は溶液 A の方が少しよい。
- ・過硫酸アンモニウム溶液：溶液を 1 ヶ月くらいは -20℃で保存できる。重合条件が微妙なので、同じ溶液を用いて、最適条件を固定することがもっとも重要である。

電気泳動における注意

- ・泳動するサンプルは約 3 μ g Chl になるよう調整する。サンプル量が多すぎると、持ち込みの脂質が過剰になり、SDS と脂質の混合ミセルの泳動位置が先端から遅れて、低分子タンパク質の泳動を妨害する。
- ・濃縮ゲルにも 7.5 M 尿素が含まれており、上部電極液を入れた後、サンプルをロードするまでに、周りのゲルから尿素が溶けだし、ウェルの底には高濃度の尿素が蓄積する。そのため、サンプル溶液に十分な重さがないと、ロードしたサンプルが浮き上がってくる。対策としては、60% (w/v) ショ糖溶液をサンプル溶液に少量添加するとともに、ロードの直前にウェルの底の尿素を含む液をシリンジで除去する。

染色液：0.04% クーマジープリリアントブルー-R-250 (CBB)，50% メタノール，10% 酢酸で、室温で 1 時間以上、ゆっくり振盪しながら行う。筆者らは CBB ストック液 (最終 0.08% CBB，100% メタノール) を用意して、使用直前に CBB ストック液 100 mL，酢酸 20 mL (最終 10%)，H₂O 80 mL (合計 200 mL) を混合し、すぐに使用している。CBB の浸透性は悪いので、染色時間が短いとゲル内部のタンパク質は十分には染色されない。これはゲルを切ってみるとよく分かる。なお、CBB は製品によって純度や不純物にちがいがあ、染色性が異なることがある。筆者らは Bio-Rad 社のものを使用しているが、この色素は不純物はそれほど多くなく、不溶物を濾過除去する必要はない。しか

し、水などと混合後は長く放置すると CBB が凝集して不溶物をつくりゲル表面を汚す。なお、この汚れはメタノールで洗い落とすこともできる。一度使用した染色液にはゲル中の SDS が溶けだしており、CBB の染色性を抑制するので、再利用はしない。CBB ストック液は安定であるが、メタノールと酢酸を混合すると、エステル生成が起こるので、エステル臭が強くなった染色液は未使用でも使用しない。

脱色：短時間の脱色は、25% メタノール，10% 酢酸の水溶液で行う。また、overnight や長期間の脱色もしくは放置するときは、10% 酢酸に浸し、キムワイプやクリネックスなどのセルロースパルプを折りたたんで同じ容器に入れておく。これらのセルロースパルプは溶液中の CBB の凝集物をトラップしてゲル表面の汚染を軽減してくれる (メタノール濃度は 15% 以下のときに限る)。

4.f.3 Western blotting 法

筆者らは合成ペプチドや大腸菌で発現させた融合タンパク質に対する特異抗体の作製を試みた。いくつかの小型サブユニット (PsbI, PsbTc, PsbK など) に対するウサギの抗体は抗体価は高くないが Western blotting に使用できた⁴⁾。一方、PsbM に対する抗体は免疫用の抗原とは反応したが、チラコイド膜中の PsbM タンパク質を実用レベルで検出できなかった⁵⁾。小型サブユニットの膜表在性領域は限定されており、エピトープとして十分でなかったと考えられ、さらに検討が必要である。

4.f.4 エドマン分解法

N 末端アミノ酸配列の決定はタンパク質同定の鍵である。SDS-urea-PAGE で展開したバンドを PVDF 膜 (polyvinylidene difluoride) にプロットし、プロテインシーケンサーで N 末端アミノ酸配列を決定する。この方法は、アミノ酸配列として確実にタンパク質を同定できるが、プロテインシーケンサーの検出感度が低いことが欠点である。小型サブユニットのうちでも PsbJ タンパク質は、ほとんど検出できない。その理由は明らかではないが、SDS-urea-PAGE でも分離されるバンドが幅広くなって、検出感度に到達していないためかもしれない。

PVDF 膜 (0.2 μ m 孔径，ミリポア社のイモビロン PSQ グレードなどがある) に電氣的にプロットし、アミドブラック 10 B で染色し、目的のバンドを切り出す。プロット装置はセミドライ型が効率がよい。染色液の組成

は、0.1% アミドブラック 10 B, 50%メタノール, 10% 酢酸で、染色時間は1-2分間で十分である。脱色は ddH₂O のみでよい。CBB も染色剤として使用できるが、バックグラウンドが強く染色されるので、脱色作業をいねいに行う必要がある。プロテインシーケンサーには、感度に定評がある Procise システム（アプライドバイオシステムズ）があるが、メンテナンスが面倒である。一方、島津のシーケンサー（モデル PPSQ-20 など）は HPLC システムの溶離液としてアセトニトリル溶液を再利用することができ、運転費用が安く、個人でもある程度メンテナンスが可能であるが、感度はやや落ちる。

いくつかの小型タンパク質の N 末端はホルミル化されており、エドマン分解を受けないが、0.6 N HCl 処理によって除去することができる。切り出した PVDF 膜のバンドをエッペンチューブに入れ、0.6 N HCl 溶液に浸し、12~24 時間ほどインキュベートする。なお、PVDF 膜の表面は非常に疎水的で、一度乾燥すると水溶液（希塩酸も同様）はほとんどはじかれる。しかし、塩酸は揮発性なので、PVDF 膜を入れたチューブをボルテックスなどでよく混合しつづければ、十分な結果が得られる。

SDS-urea-PAGE の分離能はかなり高いが、切り出した 1 本のバンドをシーケンサーで分析しても、複数のアミノ酸シグナルが得られることも多い。異なる小型サブユニットが微妙にオーバーラップして泳動されるためである。既知の配列に相当するシグナルを差し引くか、近接したバンドも分析して、それらのシグナル強度を比較することで、特定のタンパク質の配列を知ることができる。また、各アミノ酸のシグナル強度から、その存在量をおおまかに推定することもできる。しかし、タンパク質によってプロット効率は異なり、エドマン分解での切出効率や HPLC でのピークの形状などはアミノ酸残基の種類によって異なるので、単純にアミノ酸ピークの高さだけで存在量を推定するのは危険である。異なるタンパク質の同じアミノ酸残基のピーク高を比較したり、異なる標品での同じタンパク質の同じアミノ酸残基のピーク高を相互に比較することで、それらの存在量の変化も議論できる。

4.f.5 質量分析法

質量分析法は感度が非常に高く、脱ホルミル化のような前処理を必要としないなど便利な点が多いが、アミノ酸配列を直接決定するのではなく、分子質量と合致する配列を推定しているだけであり、ゲノム情報が必須である。また、SDS-PAGE のバンドを抽出して分析するだけ

でなく、細胞や光化学系複合体などをそのまま網羅的に分析できることも大きな利点である。しかし、疎水性ペプチドや低分子タンパク質の分析は不得手であり、膜貫通性の小型サブユニットの検出はほとんど報告されていない。筆者らは、シアノバクテリア *Synechocystis* 全タンパク質の網羅的な解析を行い、全遺伝子の約 45% の産物を質量分析で検出した⁶⁾。しかし、系 II に絞ると、検出できたのは PsbA PsbB PsbC PsbD PsbE psbO PsbU PsbV PsbZ だけで、ほとんどの小型サブユニットは検出されていない。しかし、近年の分析法の進歩により、光化学系 II 複合体を出発標品とすれば、ほとんどの小型サブユニットも検出できるようになってきた⁷⁾。このため、SDS-PAGE で予想外の位置に泳動されるタンパク質でも同定できるメリットもある。筆者らの具体例としては、PsbTc の C 末領域にカセットを導入して本来のバンドが消滅したので遺伝子破壊できたつもりであったが、質量分析によって C 末の truncation であることが判明したことがある⁸⁾。質量分析の欠点としては、シグナル強度がペプチド鎖の配列や特性に大きく依存するため、異なるタンパク質の量比を議論することはほとんどできない。この欠点も、異なる同位体でラベルした標品を同時に質量分析することで、標品間のタンパク質の変動を追跡することが可能になったが、まだ小型サブユニットの分析に適用された報告はない。

4.f.6 遺伝子操作法

これまでに多数のタンパク質が光化学系複合体などに結合していることが報告されている。上述したエドマン分解法でも質量分析法でも、検出できたタンパク質がすべてその複合体に特異的に結合しているのかそれとも非特異的なものか、判断できないものも多い。そのためには、これらのタンパク質の遺伝子进行操作してその影響を調べることや、タグを導入してマイルドな条件でタンパク質（複合体）を単離すること⁹⁾、抗体の代わりにタグを検出するなどさまざまな遺伝子工学的アプローチを組み合わせることが重要になってきている。

通常の遺伝子破壊の手法を小型サブユニットに応用する場合は、標的 ORF のサイズが小さいため、制限酵素の認識部位が限定される。小型サブユニットの遺伝子破壊では、わずかな残基の有無でも本来の破壊株の表現型に影響が出るので、とくに注意が必要であることは、4.f.5 の PsbTc でも述べた⁸⁾。多くの小型サブユニットは膜貫通性という意味では「膜内在性」といえるが、光化学系複合体において周辺部に結合するという意味では「外在

性 peripheral」といえる。外在性のサブユニットは複合体に強く結合していないことが多い。このような小型サブユニットの性質を調べるには、4.f.1～5の生化学的解析と本項の遺伝子操作の組合せが必要で、そのような材料としては好熱性シアノバクテリアが適していると考えられる。好熱性シアノバクテリアの形質転換法については、5.1 a を参照されたい。

最近の系II複合体の結晶構造を決定した論文(Guskov et al. *Nature Struct. Mol. Biol.* 16 (2009) P.334) では、PsbJ のN末端はアセチル化されていると推定している。アセチル化されたポリペプチドの配列はエドマン分解では決定できない。したがって、アセチル化がPsbJ タンパク質がこれまで検出されなかった理由かもしれない。なお、その根拠としては、MALDI-TOF 型の質量分析によって求めた分子質量 4017 Da がアセチル化されたPsbJ と一致する。しかし、エドマン分解でシグナルが得られるPsbF もアセチル化を仮定するなど、質量分析法にもまだ問題があるようである。

文献

- 1) U. K. Laemmli, *Nature* **227** (1970) P.680.
- 2) H. Schagger & G. von Jagow, *Anal. Biochem.* **166** (1987) P.368.
- 3) M. Ikeuchi, & Y. Inoue, *Plant Cell Physiol.* **29** (1988) P. 1233.
- 4) M. Ikeuchi, & Y. Inoue, *FEBS Lett.* **241** (1988) P.99.
- 5) 青山智佳, 修士論文, (2003).
- 6) Y. Ishino, H. Okada, M. Ikeuchi, & H. Taniguchi, *Proteomics* **7** (2007) P.4053.
- 7) M. M. Nowaczyk, 私信.
- 8) T. Henmi, M. Iwai, M. Ikeuchi, K. Kawakami, J. R. Shen, & N. Kamiya, *J. Synchrotron Radiat.* **15** (2008) P. 304.
- 9) H. Fey, D. Piano, R. Horn, D. Fischer, M. Schmidt, S. Ruf, W. P. Schroder, R. Bock, & C. Buchel, *Biochim. Biophys. Acta* **1777** (2008) P.1501.