HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Native-Green PAGE
Author(s)	菓子野, 康浩
Description	3章 単離・精製・活性測定 6. タンパク質 c
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, 377-380
Issue Date	2009-03-31
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/39169
Type	departmental bulletin paper
File Information	67-054.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

6．タンパク質
c．Native-Green PAGE

菓子野康浩[1)]

光化学系Ⅰ複合体や光化学系Ⅱ複合体などのクロロフィル結合タンパク質をクロロフィルを結合した状態で分離し，その生化学的性質を解析するための方法のひとつとして，電気泳動的に分離することが行われてきた．いわゆる Native-PAGE であるが，得られるバンドが緑色をしているため，Native-Green PAGE とも呼ばれる．本節では，いくつかの Native-Green PAGE について，実験方法を簡単に紹介する．

Native-Green PAGE

Yasuhiro Kashino

For the biochemical analysis of chlorophyll-binding proteins such as photosystem I and II complexes, native PAGE is one of the tool to separate those proteins.　The chlorophyll-binding proteins are colored in green on the gel.　In this section, outline of this electrophoresis system and the experimental procedure will be presented.

6.c.1　Native-Green PAGE

ポリアクリルアミドゲルなどを担体にした電気泳動は，タンパク質やタンパク質複合体を電荷や大きさによって分離する．その分離能は非常に高い．そのような電気泳動の中でも，タンパク質を変性させずに泳動し，タンパク質やタンパク質複合体を分離する電気泳動が Native PAGE（非変性電気泳動）である．Native PAGE によりタンパク質やタンパク質複合体を分離し，得られたタンパク質バンドの活性をゲル内で測定することや（活性染色），ゲルからタンパク質複合体などを抽出し，そのタンパク質組成，補因子の分析など生化学的な分析に用いられる．厚みのあるゲル等により，活性を保持したタンパク質やタンパク質複合体の精製に用いることも可能である．

光合成研究の分野でも，Native PAGE は盛んに行われてきた[1−3]．葉緑体やチラコイド膜を材料にしてこのような Native PAGE を行うと，光化学系Ⅰ複合体，光化学系Ⅱ複合体，光捕集クロロフィル結合タンパク質（LHC），などのクロロフィル結合タンパク質がバンドとして分離される．そしてそのバンドが緑色を呈していることから，Native-Green PAGE とも呼ばれる．穏和な界面活性剤によりチラコイド膜を可溶化し，Native-Green PAGE を行って生理学的に完全な構成の光化学系Ⅰ複合体，光化学系Ⅱ複合体などを分離し，そのタンパク質組成を詳細に分析することも可能であろう．また一方，複合体を部分的に解体するほどの界面活性剤処理を行って Native-Green PAGE を行うことで，サブユニット間の相互位置関係を解析する手段として用いることも可能であろう．タンパク質複合体の精製の場合と同様，Native-Green PAGE の際の可溶化およびゲルに用いる界面活性剤の種類や濃度，組み合わせにより，多様なアプリケーションが可能である．しかしこれは，界面活性剤の条件を適切に設定する必要があることも意味する．本稿では，近年用いられ始めた Clear-Native PAGE や，古典的な Davis の系など，少数の例であるが実験方法を紹介する．また活性染色の例も最後の項で紹介する．

6.c.2　Clear-Native PAGE

これは，前節で概説した Blue-Native PAGE の変方である．Blue-Native　PAGE[4−6] では，陰極液（Cathode buffer）が濃い群青色をしており，泳動にともない陰極液中の Coomassie Blue G-250 がゲル中に拡散していく．このために泳動中はバンドの認識が困難である場合が多い．ただし，泳動終了後にゲルを取り出すと，多量にあるクロロフィルタンパク質（複合体）は緑色のバンドとして認識できるので，Blue-Native　PAGE も Native-Green PAGE の一種ではある．Clear-Native PAGE[7,8] は，基本的には Blue-Native PAGE における陰極液中の Coomassie Blue G-250 を界面活性剤に置き換えたものである．これにより，泳動中もゲルは着色されず（clear），

1）兵庫県立大学大学院生命理学研究科

クロロフィルタンパク質は緑色のバンドとして分離される．バックグランドの濃い群青色がないため，クロロフィルタンパク質以外のタンパク質（複合体）の活性染色を行うことなども容易である．個人的な見解ではあるが，この系と界面活性剤との組み合わせを工夫することにより，多様なクロロフィル複合体および膜タンパク質複合体に応用でき，後に紹介する他の方法に取って代わることができるのではないかと考えられる．

［実験方法］

表1にClear-Native PAGEのためのストック溶液を示した．これは，6 b．Blue-Native PAGEに記した表1の陰極液に含まれるCoomassie Blue G-250を0.02%(w/v)n-dedecyl-β-D-maltoside(DDM)，0.05%(w/v)sodium deoxycholate(DOC)の組み合わせに置き換えたものである．泳動は，低温でBlue-Native PAGEと同様に行う．ただし，可溶化処理後の標品をそのままロードし，Blue-Native PAGEの際に必要であった陰極液の交換作業は必要ない．可溶化標品の比重が低い場合は，グリセロール等で比重を高くすると良い．Wittigら[7]は，上記の界面活性剤の組み合わせ以外に，0.05%(w/v)Triton X-100，0.05%(w/v)DOCの組み合わせ，0.01%(w/v)DDM，0.05%(w/v)DOCの組み合わせも紹介している．いずれの条件に於いても，陰イオン性界面活性剤DOCが含まれている．Wittigら[7]の報告等を参考にして，手元の標品を分離するのに適切な界面活性剤の組み合わせを検討すると良い．

必要に応じ，二次元目のSDS-PAGEを行う．一次元目のゲルからゲルストリップを切り出す際は，カッターナイフの刃を垂直に当て，押し切るようにすると切りやすい．

表1：Clear-Native PAGEのためのストック溶液

ストック溶液	組成
Cathode Buffer (pH 7.0)	50 mM Tricine, 7.5 mM Imidazole 0.02%(w/v)DDM, 0.05%(w/v)DOC
Anode Buffer(pH 7.0)	25 mM Imidazole-HCl
AB mix	49.5%T, 3%C (48%(w/v)Acrylamide,1.5%(w/v) methylenebisacrylamide)
Gel Buffer(pH 7.0)	75 mM Imidazole-HCl 1.5 M 6-Aminocaproic acid

DDM，n-dodecyl-β-D-maltoside
DOC，sodium deoxycholate
未重合のアクリルアミドは高い神経毒性があるので，取り扱いには充分な注意が必要である．また，アクリルアミドを含む廃液は回収し，ゲル化させてから廃棄する．

6.c.3 Allenの系

Native PAGEとはいいながら，泳動時に一部のクロロフィルがタンパク質から遊離し，フリーのクロロフィルとして泳動先端に現れてしまう場合があった．しかし，穏和な非イオン性の界面活性剤が導入されるようになり，このような問題点が解決されていった．その例の一つがここで紹介するAllen & Staehelinによる系である[3]．この系では，従来の方法に比べて遊離色素を減らしてクロロフィル結合タンパク質（複合体）を分離することが可能となった．しかし，電極液に0.1%(w/v)SDSを用いているためか，光合成色素が若干遊離することは避けられないようである．複数の界面活性剤を組み合わせてチラコイド膜を可溶化した後，低温で電気泳動を行う．

［実験方法］

表2のようにストック溶液を調製し，表3にしたがってゲルを作製する．分離するクロロフィル結合タンパク質により，アクリルアミド濃度の調整が必要である．AllenとSteahelinによるオリジナルの報告[3]では，クラミドモナスを材料にして8%(w/v)アクリルアミドのゲルが使われている．予備実験により，濃縮ゲルが必要か

表2：Allenの系のためのストック溶液

ストック溶液	組成
X10分離ゲル緩衝液	250 mM Tris, 500 mM Glycine (pH 8.3)
X10濃縮ゲル緩衝液	250 mM Tris, 500 mM Glycine (pH 6.3)
50%アクリルアミド溶液	49.5%(w/v)Acrylamide, 0.5%(w/v) methylenebisacrylamide
電極液	25 mM Tris, 192 mM Glycine, 0.1%(w/v)SDS

電極液は，Laemmliの系のものと同じ組成である．

表3：Allenの系におけるゲル液の調製（7%(w/v)アクリルアミド，ミニゲル）

	分離ゲル	濃縮ゲル
X10分離ゲル緩衝液	1 mL	−
X10濃縮ゲル緩衝液	−	1 mL
50%アクリルアミド溶液	1.4 mL	0.6 mL
純水	7.6 mL	8.3 mL
(体積)	(10 mL)	(10 mL)
10% APS	50 μL	100 μL
TEMED	5 μL	10 μL

未重合のアクリルアミドは高い神経毒性があるので，取り扱いには充分な注意が必要である．また，アクリルアミドを含む廃液は回収し，ゲル化させてから廃棄する．

表4：Davisの系のためのストック溶液

ストック溶液	組成
A（分離ゲル緩衝液）	1.5 M Tris-HCl（pH 8.9），0.12% TEMED
B（濃縮ゲル緩衝液）	494 mM Tris（pH 6.7），0.46% TEMED
C（28% アクリルアミド溶液）	28%（w/v）Acrylamide, 0.735%（w/v）methylenebisacrylamide
D/2	10%（w/v）Acrylamide, 2.5%（w/v）methylenebisacrylamide
E（リボフラビン）	0.004%（w/v）リボフラビン
F（40% スクロース）	40%（w/v）スクロース
G（10% APS）	10%（w/v）過硫酸アンモニウム
電極液（pH 8.3）（x 10） （pH を合わせる必要はない）	50 mM Tris, 384 mM Glycine

否かを検討する．また，予備実験により，チラコイド膜の可溶化のための界面活性剤の種類，濃度を比較検討する．0.5 mg Chl/mL（0.05% w/v）の濃度のチラコイド膜に対して，界面活性剤の影響を検討するものである．Allen と Steahelin による報告[3]では，0.45%（w/v）n-octyl-β-D-glucoside（OG），0.45%（w/v）DDM，0.1%（w/v）LDS（Chl: OG: DDM: LDS＝1：9：9：2）の条件で氷上で30分間の処理が行われている．Chl: OG: DDM: LDS＝1：18：18：1 や Chl: OG: DDM: LDS＝1：20：20：4，などの条件で可溶化を行い，実際に泳動を行って濃度条件や界面活性剤の種類を検討する．我々は，*Synechocystis* sp. PCC 6803 のチラコイド膜を Chl: OG: DDM: LDS＝1：10：10：1，キュウリのチラコイド膜を Chl: OG: DDM: LDS＝1：20：20：2，で処理し，2 mA で約2時間の泳動（ミニゲル）を行うことにより，クロロフィル結合タンパク質を分離することができた．

必要に応じ，二次元目の SDS-PAGE を行う．

6.c.4 Davisの系[9]

古くから用いられてきた系である．現在でも，より穏和な界面活性剤で可溶化処理を行い，クロロフィル結合タンパク質を分離する目的に用いられている[10,11]．表4のストック溶液を調製し，表5にしたがってゲルを作製する．界面活性剤の種類や濃度は，用途に応じて検討を行う．Yamazaki ら[10]，Chen ら[11]は，DDM を用いて泳動を行っている．分離ゲル液を脱気し，過硫酸アンモニウム（APS）を加え，静かに撹拌してからゲル板に注ぎ込む．純水を静かに重層し，ゲル化するまで静置する．分離ゲルがゲル化したら，重層した純水を排出し，濃縮ゲル液にE（リボフラビン溶液）を加える．濃縮ゲルの上面を共洗いし，濃縮ゲル液を加えてコームを差し，蛍光灯の光により光重合を行う．濃縮ゲル液の黄色い色が消えて白くなると，ゲル化が完了している．

チラコイド膜を界面活性剤により可溶化し，遠心して可溶化上清を得，低温で電気泳動を行う．必要に応じ，二次元目の SDS-PAGE を行う．

Thermosynechococcus elongatus チラコイド膜（1 mg Chl/mL，50 mM Tris（pH 7.5），10 mM NaCl）を 0.8% OG で処理し（室温，30分），遠心後の上清を上記のジギトニンを含む Davis の系で泳動を行うことにより，光化学系IIコア複合体を得ることができる．このゲル条件では，10 mA，30分程度の泳動により，ゲル上部から光化学系I複合体（濃い緑色），光化学系IIコア複合体（やや薄い緑色），カロチノイド（黄色），フィコビリゾーム（青色）の順でバンドが得られる．

6.c.5 デオキシコール酸を含む系

我々の研究室では，ラン色細菌のチラコイド膜を泳動し，ジアフォラーゼ活性による活性染色にも用いてい

表5：Davisの系におけるゲル液の調製（スラブゲル）
（5%（w/v）アクリルアミド，0.2%ジギトニン）

	分離ゲル	濃縮ゲル
A（分離ゲル緩衝液）	5.25 mL	−
B（濃縮ゲル緩衝液）	−	0.6 mL
C（28%アクリルアミド溶液）	3.75 mL	−
D/2	−	1.2 mL
E（リボフラビン）*	−	0.6*
F（40%　スクロース）	−	2.4
純水	12 mL	8.3 mL
ジギトニン	42 mg	9.6 mg
（体積）	（21 mL）	（4.8 mL）
10%　APS	150 μL	−

*E（リボフラビン）は，濃縮ゲルを作製する直前に加える．
未重合のアクリルアミドは高い神経毒性があるので，取り扱いには充分な注意が必要である．また，アクリルアミドを含む廃液は回収し，ゲル化させてから廃棄する．

表 6：デオキシコール酸を含む系のためのストック溶液

ストック溶液	組成
AB Mix	49.5%T, 3%C (48% (w/v) Acrylamide, 1.5% (w/v) methylenebisacrylamide)
x10 ゲル緩衝液	0.25 M Tris, 1.9 M Glycine
60%Sucrose	60% (w/v) Sucrose
5 %DOC	5% (w/v) NaDOC
陰極液（Cathode buffer）	25 mM Tris, 0.192 M Glycine, 0.1% (w/v) NaDOC
陽極液（Anode buffer）	25 mM Tris, 0.192 M Glycine

表 7：デオキシコール酸を含む系におけるゲル液の調製（スラブゲル）
(5-18% (w/v) アクリルアミド，0.1%デオキシコール酸)

	アクリルアミド溶液		
	5 %T	18%T	Stacking (4%T)
AB Mix	1.0 mL	3.67 mL	0.5 mL
x10 ゲル緩衝液	1.0 mL	1.0 mL	0.6 mL
60%Sucrose	−	3.0 mL	−
5 %DOC	0.2 mL	0.2 mL	0.12 mL
純水	7.75 mL	2.1 mL	4.73 mL
(体積)	(10 mL)	(10 mL)	(6 mL)
10%過硫酸アンモニウム	50 μL	30 μL	50 μL
TEMED	5.0 μL	3.0 μL	5.0 μL

る[12]．表 6 のストック溶液を調製し，表 7 にしたがってゲルを作製する．*Synechocystis* sp. PCC 6803 のチラコイド膜 (25% glycerol，10 mM $CaCl_2$，10 mM $MgCl_2$，50 mM MES(pH 6.5)) を 0.5 mg Chl/mL，1% DDM で 30 分間，氷上にて可溶化処理する．遠心後，可溶化上清 (1 レーン当たり 10 μg Chl 相当量) を上記ゲルにロードし，4 ℃にて泳動を行う．電圧は，当初 100 V を印加し，段階的に 400 V まで上げていく．必要に応じ，二次元目の SDS-PAGE を行う．

ジアフォラーゼ活性による活性染色を行う場合，泳動終了後のゲルを染色緩衝液 (50 mM Tris-HCl(pH 7.5)，0.25 mM EDTA，and 0.1 mg/mL nitroblue tetrazolium chloride (NBT)) 中で 30 分程度振とうし，0.2 mM NADH または 0.2 mM NADPH を添加する．青い色が充分に発色するまで振とうし，その後純水に置き換える．

参考文献

1）J. M. Anderson, Biochim Biophys Acta **591** (1980) P. 113.
2）A. Yamagishi & S. Katoh, Arch Biochem Biophys **225** (1983) P.836.
3）K. D. Allen & L. A. Staehelin, Anal Biochem **194** (1991) P.214.
4）H. Schägger & G. von Jagow, Anal Biochem **199** (1991) P.223.
5）H. Schägger, in Membrane Protein Purification and Crystallization: A Practical Guide, ed C. Hunte, G. von Jagow, & H. Schägger (Academic Press, Amsterdam, 2002), P.105.
6）I. Wittig, H. P. Braun, & H. Schägger, Nat Protoc **1** (2006) P.418.
7）I. Wittig, M. Karas, & H. Schägger, Mol Cell Proteomics **6** (2007) P.1215.
8）I. Wittig, R. Carrozzo, F. M. Santorelli, & H. Schägger, Electrophoresis **28** (2007) P.3811.
9）B. J. Davis, Ann N Y Acad Sci **121** (1964) P.404.
10）J. Y. Yamazaki, A. Kozu, & Y. Fukunaga, Photosynth Res **89** (2006) P.19.
11）G. Chen, X. Niu, X. Chen, L. Li, T. Kuang, & S. Li, Photosynth Res **96** (2008) P.75.
12）J. Ooyabu, M. Ohtsuka, Y. Kashino, H. Koike, & K. Satoh, Biosci Biotech Biochem **72** (2008) P.3180.