HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	ショ糖密度勾配超遠心法
Author(s)	岩井, 優和; 皆川, 純
Description	3章 単離・精製・活性測定 6. タンパク質 d-2
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, 385-386
Issue Date	2009-03-31
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/39171
Type	departmental bulletin paper
File Information	67-056.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

6．タンパク質
d-2．ショ糖密度勾配超遠心法

岩井　優和[1)]，皆川　　純[1)]

光合成反応は，光化学系Ⅰ，光化学系Ⅱを始め，いくつものタンパク質複合体，あるいはタンパク質超複合体によって行われる．「ショ糖密度勾配超遠心法」は，これらの複合体を大きさによって分画する場合に広く用いられている．本項では，緑藻クラミドモナスの葉緑体上の光化学系複合体を例に取り，ショ糖密度勾配超遠心法のプロトコルを紹介する．

Sucrose density gradient ultracentrifugation

Masakazu Iwai, Jun Minagawa

Sucrose density grandient ultracentrifugation has been widely used to separate pigment-binding protein (super) complexes on the photosynthetic membranes. In this chapter, we describe a standard protocol for sucrose density gradient ultracentrifugation of the *C. reinhardtii* thylakoid membrane proteins.

6.d-2.1　背景

密度勾配を形成したショ糖溶液上に混合物からなるサンプルを重層し超遠心を行うことで，様々なタンパク質・タンパク質複合体粒子，さらにはさまざまなオルガネラを分画することができる．粒子の沈降速度は沈降係数（粒子の比重，形，質量などによって決定される）に依存するのに対し，平衡に達した地点での沈降距離は粒子の比重に依存する．そのため，光化学系タンパク質複合体やLHCタンパク質など比較的近い比重を持つ粒子を分子量の違いによって分離するには，平衡に達するまでの間の沈降速度の違いを利用してバンドを形成させる(rate zonal centrifugation)．一方，オルガネラを分画する場合は，平衡に達するまで遠心し，密度の違いを利用してバンドを形成させる(isopycnic centrifugation)．この方法で得られたタンパク質複合体試料は比較的無傷に保たれるため，ゲルろ過などの各種クロマトグラフィーや結晶化に用いるのに適している．ショ糖以外にはグリセロールの密度勾配を用いる場合があり，例えばPSIIコアのdimerとmonomerを分離することができる[1)]．

6.d-2.2　プロトコル

ここでは日立超遠心スイングローターP40STと専用遠沈管13PAチューブ(13 mL)を使用した場合を例に取り解説する．グラジエントは市販のグラジエントメーカーを使うのが一般的だが，以下に示すステップグラジエントを用いる方法は，より簡便で多くの場合良好な結果が得られる．扱うサンプルによってバッファー組成は異なるが，ここではチラコイド膜からLHCII，光化学系1超複合体，光化学系2複合体を分離する方法を示す．

1．1.3 M，1.0 M，0.7 M，0.4 M，0.1 Mのショ糖を含むバッファー（25 mM MES，pH 6.5/NaOH）を各2.2 mLずつ，遠沈管の数だけ用意する．
2．界面活性剤（β-DM）を終濃度0.05%になるように各バッファーに添加する．
3．まず，2.1 mLの1.3 Mバッファーを遠沈管に入れる．この時，ピペッティングで，空気の泡を水面につくる．その泡がクッションの役目となり，次の1.0 Mバッファーの重層が容易になる．
4．同様に，1.0 M，0.7 M，0.4 M，0.1 Mの順にバッファーをゆっくりと重層する．(このようにして作成したステップグラディエントは，超遠心後はリニアグラディエントとなる．）完成したショ糖密度勾配溶液は4℃で保存する．
5．精製したチラコイド膜を25 mM MES，pH 6.5/NaOHで2度洗浄したのち，終濃度0.8 mg Chl/mLになるよう希釈する．
6．チラコイド膜懸濁液にβ-DM（終濃度0.8%）を加え，撹拌しながら4℃で10分間可溶化する．
7．可溶化したチラコイド膜（0.3〜0.5 mL）を4．で作成したショ糖密度勾配に重層し，超遠心(100,000 g，24時間）を行う．

1）北海道大学低温科学研究所

8．超遠心後，遠沈管の底にシリンジで穴を開け，溶液をチューブや 96 穴プレートに分画する．少数のバンドのみを回収する場合は，上からシリンジなどで吸い出してもよい．通常，上から LHCII（A 1 バンド），PSII コア粒子（A 2 バンド），PSI-LHCI 超複合体（A 3 バンド）の緑色の 3 本のバンドが得られる（図 1）．

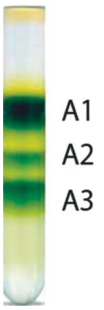

図 1：クラミドモナスより単離したチラコイド膜を可溶化し，ショ糖密度勾配超遠心により 3 つの複合体に分離した（Ref. 2 を改変）．

参考文献

1）I. Sakurai, J.-R. Shen, J. Leng, S. Ohashi, M. Kobayashi, H. Wada, J. Biochem. **140** (2006) P.201.
2）H. Takahashi, M. Iwai, Y. Takahashi, & J. Minagawa, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **103** (2006) P.477.