HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	界面活性剤
Author(s)	小澤, 真一郎; 高橋, 裕一郎
Description	3章 単離・精製・活性測定 6. タンパク質 g
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, 409-413
Issue Date	2009-03-31
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/39174
Type	departmental bulletin paper
File Information	67-059.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

6．タンパク質
g．界面活性剤

小澤真一郎[1)]，高橋裕一郎[1)]

界面活性剤は光合成タンパク質の生化学的解析によく用いられる．電気泳動法による分析では，タンパク質の可溶化，変性，電荷の付与などに，膜タンパク質の精製・分析では，疎水性タンパク質の可溶化に使われる．本章では，一般的に使われる界面活性剤について紹介する．

Detergents

Shin-ichiro Ozawa, Yuichiro Takahashi

Detergents are frequently used for biochemical analyses of photosynthetic proteins. For polyacrylamide gel electrophoresis, detergents are used to solubilize and/or denature proteins. For purification of membrane proteins, detergents are also required for solubilization of water-insoluble proteins. In this chapter, detergents that are frequently used in protein biochemistry are introduced.

6.g.1　界面活性剤の種類

界面活性剤（detergent）は，親水基と疎水基をもつ両親媒性分子（amphiphilic molecule）で，ミセルを形成することにより，疎水性分子を可溶化する作用をもつ．親水基に正もしくは負の電荷をもつイオン性界面活性剤（ionic detergent），正と負電荷の両方をもつ両性界面活性剤（zwitterionic detergent）と電荷をもたない非イオン性界面活性剤（nonionic detergent）がある．イオン性界面活性剤はタンパク質の変性作用が強く，非イオン性界面活性剤は変性作用が弱いと一般的に考えられているが，例外もある．イオン性界面活性剤を加えるとそのミセルを結合したタンパク質の電荷が増加し，電気泳動でタンパク質を分析するときの分離がよくなる．しかし，Isoelectric Focusing や，疎水性，ヒドロキシアパタイトおよびイオン交換クロマトグラフィーにはイオン性界面活性剤は適しない．

水溶液中での界面活性剤の濃度が，臨界ミセル濃度（CMC, critical micelle concentration）より高いと，界面活性剤は親水基を外側に，疎水基を内側にしたミセルを形成する．界面活性剤のミセルサイズが大きい，もしくは CMC が低いと，界面活性剤を透析により除去するのは難しくなる．可溶化した膜タンパク質の精製に用いる溶液には，可溶化状態を維持するために界面活性剤を加える必要がある．CMC は溶液の温度，イオン強度および pH により変化するので，溶液中には CMC より高めの界面活性剤を加える．光合成タンパク質の解析によく使われる界面活性剤のリスト（表 1）と分子構造（図 1）をまとめた．

6.g.2　タンパク質の分析に使われる界面活性剤

SDS は，ポリペプチドの分析によく使われる SDS-PAGE（6 a 章参照）において，分析するタンパク質を変性させるために使用される．親水基として負電荷の硫酸基をもち，変性したポリペプチドに負電荷を与える．したがって，SDS-PAGE では，ポリペプチドはそのサイズに依存した距離を泳動する．SDS はカリウムイオン存在下では不溶性の塩を形成するので，サンプル溶液にカリウムイオンが含まれないように注意する．

ウェスタン分析で疎水性タンパク質をゲルからフィルターへ電気泳動的にブロットするとき，ブロット溶液に SDS を加えることがある（6 h 章参照）．また，ウェスタン検出のときの非特異的な交差反応によるシグナルを減少させるとき，ハイブリダイズや洗浄する溶液に非イオン性界面活性剤の Tween20（polyoxyethylen (20) sorbitan monolaurate）を加える（6.h 章参照）．

膜タンパク質や多数のタンパク質から構成される複合体を非変性の状態で微量分析する手法として使われる Native Polyacrylamide Gel Electrophoresis（Native PAGE）には，様々な変法が報告されている．Green Polyacrylamide Gel Electrophoresis は，1964 年に Ogawa らにより報告された SDS-PAGE によるクロロ

1）岡山大学大学院自然科学研究科

表1：光合成研究に使われる界面活性剤

界面活性剤	アルキル基の炭素数	タイプ	分子量	CMC(mM)	構造
n-Decyl-β-D-maltoside	10	非イオン性	482.6	1.8	10
n-Undecyl-β-D-maltoside	11	非イオン性	512.7	0.21	10
n-Tridecyl-β-D-maltoside	13	非イオン性	524.6	0.033	10
n-Tetradecyl-β-D-maltoside(DM, DDM)	14	非イオン性	538.6	0.01	10
n-Dodecyl-β-D-thiomaltoside	12	非イオン性	526.6	0.05	9
n-Octyl-β-D-glucoside	8	非イオン性	292.4	18-20	8
Deoxycholate, sodium salt		負イオン性	414.6	2～6	2
Lauryldimethylamine-oxide(LDAO)		両性(pH＞7)，正イオン性(低pH)	229.41	0.14	6
Sodium dodecyl sulfate(SDS)	12	負イオン性	288.38	2.6	1
Litium dodecyl sulfate(LDS)	12	負イオン性			
TRITON X-100		非イオン性		0.23	3
TWEEN 20		非イオン性	1228(平均)	0.059	4
Digitonin		非イオン性	1229.3	0.5	5
Methyyl-6-*O*-(N-heptylcarbamoyl)-α-D-glucopyranoside (HECAMEG)	7	非イオン性	335.4	19.5	7

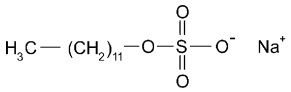
フィルタンパク質の分離法である[1]．チラコイド膜のSDSによる可溶化条件を温和にし（チラコイド膜濃度を高く，SDS濃度を低く，処理温度を低温に），電気泳動を低温で行うと，系ⅠやLHCIIなどのクロロフィルタンパク質がポリアクリルアミドゲル上にCPIやCPIIとして分離される．低温でチラコイド膜の可溶化を行うとき，SDSが析出する場合は，ナトリウム塩の代わりに低温での溶解度が高いリチウム塩のLDS（litium dodecyl sulfate）を使用することもある．Colorless Native Polyacrylamide Gel Electrophoresis（CN-PAGE）は，非イオン性界面活性剤で可溶化した膜タンパク質複合体を分離する方法である[2]．タンパク質は変性されずに，タンパク質のもつ電荷（負電荷）で電気泳動される．しかし，大きな複合体は泳動度が小さいため，分離がよくない．Blue Native Polyacrylamide Gel Electrophoresis（BN-PAGE）は，CN-PAGEの欠点を補うため，負電荷をもつCoomasie Blue R-250色素をタンパク質に結合させて電気泳動を行う（6.b章参照）[3]．その結果，タンパク質の分離が大幅に改善される．しかし，分離された膜タンパク質に青い色素が結合しているため，吸収スペクトルや活性などの分析には不適切なことがある．この方法は，SDS-PAGEと組み合わせた二次元電気泳動により，分離された複合体のサブユニット組成の分析に優れている．High Resolution Clear Native Electrophoresis（HR-CNE）は，非イオン性界面活性剤の代わりに，負の電荷をもつがタンパク質の変成作用が強くないデオキシコール酸塩（deoxy cholate）を用いる[4]．

6.g.3 膜タンパク質の可溶化に使われる界面活性剤

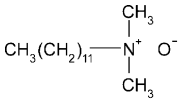
水溶性タンパク質と異なり，膜タンパク質の精製に可溶化は必須である．タンパク質の変性を最小限に抑え，かつ高い効率で可溶化しなければならない．イオン交換クロマトグラフィーでの精製には，イオン性界面活性剤は使用できない．したがって，膜タンパク質の精製には，非イオン性界面活性剤が一般的に使用される．

光合成に関与する膜タンパク質は数多く知られているが，最もよく研究されてきたのは，クロロフィルタンパク複合体やシトクロム b_6f 複合体などである．用いる光合成生物や膜タンパク質の種類により，効果的な界面活性剤は異なることが多い．これまでに可溶化効率が高く，かつタンパク質の変性作用の少ない非イオン性界面活性剤が数多く開発されてきた．

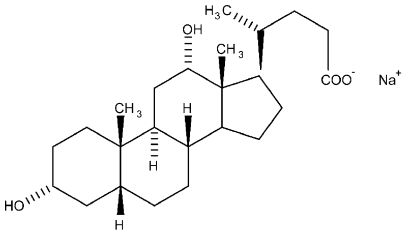
ジギトニン（digitonin）は温和な非イオン性界面活性剤で，葉緑体の膜断片やクロロフィルタンパク複合体の単離に使われる．光化学系ⅠとⅡを生化学的に分離できることを示した実験に使われた[5]．低濃度のジギトニンでチラコイド膜を処理すると，チラコイド膜のスタックした領域（グラナチラコイド）とスタックしていない領域（ストロマチラコイド）の境界で膜が切断される[5]．その結果，重い画分である，光化学系Ⅱに富むグラナチラコイドと，軽い画分である光化学系Ⅰに富むストロマチラコイドが，分画遠心により分離された．より高濃度のジギトニンでチラコイド膜を処理すると，クロロフィルタンパク質が可溶化される[6]．しかし，チラコイド膜を完全に可溶化する効率は高くなく，最近ではクロロフィルタンパク質の可溶化にはあまり使われない．



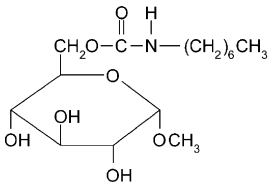
1）ドデシル硫酸ナトリウム，sodium dodecyl sulfate



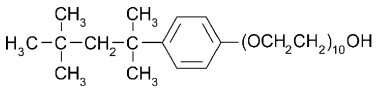
6）LDAO



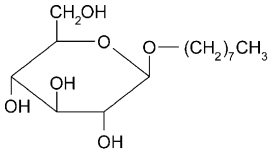
2）デオキシコール酸ナトリウム



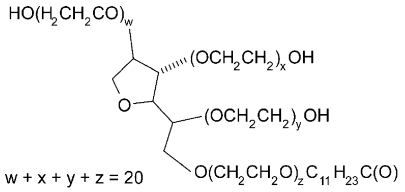
7）HECAMEG



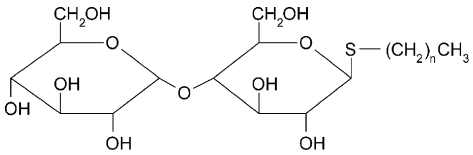
3）TRITON X-100



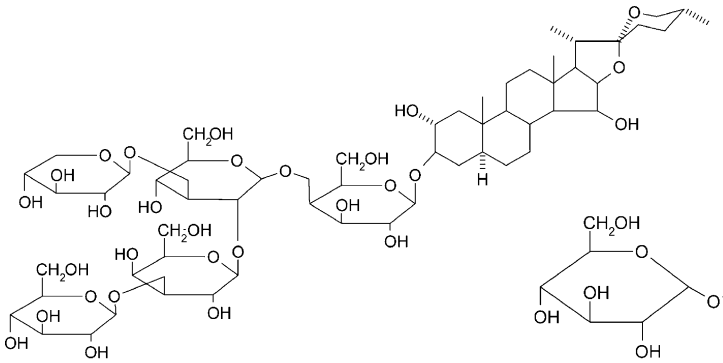
8）オクチルグルコシド



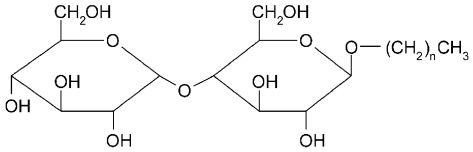
4）TWEEN 20



9）ドデシルチオマルトシド（n = 11）



5）ジギトニン，digitonin



１０）マルトースとアルキル基を持つ界面活性剤（n = 5-15）

図1：界面活性剤の分子構造

非イオン性界面活性剤は高価なものが多いが，安価である．TRITON X-100（α-[4-(1, 1, 3, 3-tetramethylbutyl) phenyl]-ω-hydroxy-poly（oxy-1, 2-ethanediyl））はポリオキシエチレン基（$-O-CH_2-CH_2-)_n-OH$ を含み，チラコイドの膜断片やクロロフィルタンパク複合体の単離に使われる．チラコイド膜を低濃度で処理すると，酸素発生活性をもつチラコイド膜のスタックした領域（光化学系II酸素発生標品）が分画遠心により単離される[7,8]．より

高濃度でチラコイド膜を可溶化すると，クロロフィルタンパク質が可溶化される．この界面活性剤を使用すると，クロロフィルタンパク質に結合するクロロフィルの吸収スペクトルが変化することがある．

LDAO（lauryldimethylamine-oxide）とオクチルグルコシド（n-octyl-β-D-glucoside）は，光合成細菌の反応中心や酸素発生活性を保持した光化学系IIの単離に有効である（4b章）．可溶化度を最適化すると，シアノバクテリアのチラコイド膜から，光化学系IIを特異的に可溶化できる．溶液のpHが7以上ではLDAOは両性界面活性剤であるが，酸性pHでは正の電荷をもつイオン性界面活性剤となる（図1）．一方，HECAMEGは，濃度を最適化するとシトクロム b_6f 複合体を特異的に可溶化できる[9]．活性の高いシトクロム b_6f 複合体を高純度に精製するのに使われる．

親水基に糖鎖（グルコースおよびマルトース）と疎水基にアルキル鎖をもつ界面活性剤は，膜タンパク質の可溶化に有効である．糖鎖がグルコースでアルキル基の炭素数が6～12の界面活性剤が入手できる（Anatrace社；http://www.anatrace.com/）．炭素数が少ないもの（7以下）はCMCが高く，炭素数が多いもの（10以上）は水に溶けにくいため，膜タンパク質の可溶化には不向きである．この系列の界面活性剤の中で最もよく利用されるのは，炭素数8のアルキル基をもつオクチルグルコシドである．また，糖鎖がマルトースでアルキル基の炭素数が6と8～16の界面活性剤が入手できる．グルコースに比べマルトースをもつ界面活性剤は，アルキル基の炭素数が多くても水への溶解度が高く，さらにタンパク質の構造や機能に対して温和であるため，膜タンパク質の解析には適している．図2に，アルキル基の炭素数11～14の界面活性剤での可溶化とクロロフィルタンパク質のショ糖密度勾配超遠心法による分離パターンを示す．炭素数が11と12のundecyl-maltosideとdodecyl-maltosideの可溶化効率と分離パターンはよく似ている．炭素数13のtridecyl-maltosideは，クロロフィルタンパク質の解離において少し温和である．炭素数14のtetradecyl-maltosideの可溶化効率は悪く，クロロフィルタンパク質の分離もやや不明瞭である．dodecyl-maltosideは，チラコイド膜の可溶化の効率と再現性が高く，光化学系I複合体や光化学系IIコア複合体の可溶化に最もよく使われる（4a章参照）[10-14]．この界面活性剤を使って単離された標品の電子伝達活性も高く保たれ，クロロフィルの吸収スペクトルの保存もよいという利点がある．結晶化のための光化学系複合体標品の精製でも優れた成果が得られている．植物の光化学系I複合体の結晶化では，dodecyl-maltosideを用いて精製した後に界面活性剤をdodecyl-thiomaltosideに置き換えて成功した例がある[14]．

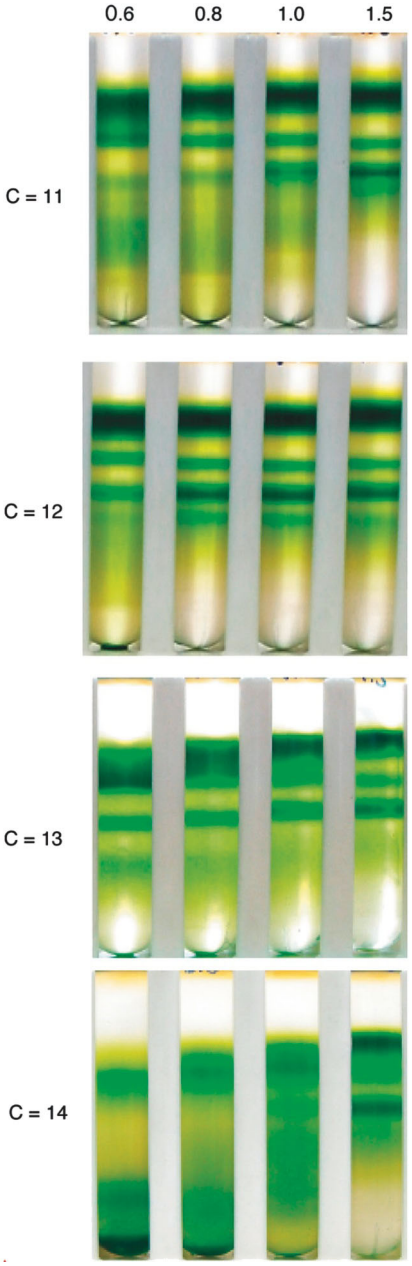


図2：親水基にマルトースを含む界面活性剤で可溶化したチラコイド膜の分離
炭素数が異なるアルキル基をもつ界面活性剤（C＝11，12，13，14はUndecyl-maltoside，Dodecyl-maltoside，Tridecyl-maltoside，Tetradecyl-maltosideに相当する）で可溶化した時のクロロフィルタンパク質の分離パターンへの影響．チラコイド膜を異なる濃度の界面活性剤で可溶化し，ショ糖密度勾配超遠心法でクロロフィルタンパク質を分離した．

6.g.4 おわりに

界面活性剤はタンパク質の分析や膜タンパク質の可溶化に必須であるが，用いる光合成生物や対象とするタンパク質により，最適な界面活性剤が異なることが，これまでの研究で明らかにされている．しかし，すべての種類の界面活性剤が，あらゆる光合成生物や膜タンパク質に系統的に試されてきた訳ではない．したがって，より高い純度と活性をもつ膜タンパク質を単離・精製するには，界面活性剤の選択や可溶化条件の最適化が重要である．また，構造解析のための膜タンパク質の結晶化が盛んに行われるようになってきた．この場合，精製された膜タンパク質の純度や均一性が重要である．さらに用いた界面活性剤の結晶化に与える影響も無視できないため，界面活性剤は慎重に選択する必要がある．最後に，界面活性剤でタンパク質を可溶化すると，プロテアーゼによる分解を受けやすくなる．この場合，プロテアーゼ阻害剤を溶液に添加する必要がある．金属プロテアーゼに対しては，0.5〜5 mM ethylenediaminetetraacetic acid(EDTA)，セリンプロテアーゼには1〜2 mM phenylmethanesulfonyl fluoride(PMSF) や2〜5 mM 6-aminocaproic aid が安価でよく使われる．

文献

1）T. Ogawa, F. Obata, & K. Shibata, Biochim Biophys Acta **112** (1966) P.223.
2）H. Schagger, W. A. Cramer, & G. von Jagow, Anal Biochem **217** (1994) P.220.
3）H. Schagger & G. von Jagow, Anal Biochem **199** (1991) P.223.
4）I. Wittig, M. Karas, & H. Schagger, Mol Cell Proteomics **6** (2007) P.1215.
5）N. K. Boardman & J. M. Anderson, Nature **203** (1964) P.166.
6）K. Satoh, Biochim Biophys Acta **546** (1979) P.84.
7）D. A. Berthold, G. T. Babcock, & C. F. Yocum, FEBS Letters **134** (1981) P.231.
8）T. Kuwabara & N. Murata, Plant and Cell Physiology **23** (1982) P.533.
9）Y. Pierre, C. Breyton, D. Kramer, & J. L. Popot, J Biol Chem **270** (1995) P.29342.
10）N. Kamiya & J. R. Shen, Proc Natl Acad Sci U S A **100** (2003) P.98.
11）S. Iwata & J. Barber, Curr Opin Struct Biol **14** (2004) P.447.
12）P. Jordan, P. Fromme, H. T. Witt, O. Klukas, W. Saenger, & N. Krauss, Nature **411** (2001) P.909.
13）B. Loll, J. Kern, W. Saenger, A. Zouni, & J. Biesiadka, Nature **438** (2005) P.1040.
14）A. Amunts, O. Drory, & N. Nelson, Nature **447** (2007) P.58.