HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	電気泳動の原理とbuffer系の比較 : SDS-PAGEからNative-PAGEへ
Author(s)	高林, 厚史; Takabayashi, TAtsushi
Citation	低温科学, 83, 221-228
Issue Date	2025-03-29
DOI	https://doi.org/10.14943/lowtemsci.83.221
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/94802
Type	departmental bulletin paper
File Information	21_p221-228_LT83.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

低温科学 83 （2025） 221–228
doi: 10.14943/lowtemsci. 83. 221

電気泳動の原理とbuffer系の比較 — SDS-PAGEからNative-PAGEへ

高林　厚史 [1)]

2024 年 12 月 2 日受付，2025 年 1 月 5 日受理

ゲル電気泳動法はタンパク質やタンパク質複合体の分離に広く用いられてきた手法である．本稿ではまず，ゲル電気泳動において考慮すべき三つの要点について説明する．すなわち，1）負電荷の付与方法，2）ゲルマトリックス，3）界面活性剤の選択である．次に，SDS-PAGE，blue-native（BN）-PAGE, clear-native（CN）-PAGEの各電気泳動法について, そのbuffer系の歴史と原理を解説する．特に，SDS-PAGEとCN-PAGEについては，標準的なbuffer系に加え，改変buffer系についても紹介する．

Principles of electrophoresis and comparison of buffer systems — from SDS-PAGE to Native-PAGE

TAtsushi Takabayashi

Gel electrophoresis is a widely used technique for the separation of proteins and protein complexes. This paper discusses three critical considerations in gel electrophoresis: 1) selection of the chemical that gives negative charge to the protein, 2) selection of the gel matrix, and 3) selection of the detergent. In addition, I review the historical development and underlying principles of buffer systems used in SDS-PAGE, blue-native (BN) PAGE, and clear-native (CN) PAGE. Special attention is given to the standard buffer systems used in SDS-PAGE and CN-PAGE, as well as modified buffer systems, two of which have been developed by the author.

キーワード：ゲル電気泳動，SDS-PAGE，BN-PAGE，CN-PAGE
Gel electrophoresis, SDS-PAGE, BN-PAGE, CN-PAGE

1．はじめに

ゲル電気泳動は核酸やタンパク質などの生体分子を分離するための手法として広く用いられてきた．分子量に応じて生体分子を分離する方法としては，他にもゲル濾過クロマトグラフィーやショ糖密度勾配遠心法などがあるが，電気泳動では負に荷電した生体分子がゲルの中を移動することで分子篩い分け効果が働き，生体分子を分子量に応じて分離できることが特徴である．そのメリットとしては，1）安価かつ短時間で分離できること，2）多サンプルを同時に分離できること，3）分離能が高いこと，4）様々な染色法と組み合わせて生体分子を可視化できること，などがあげられる．また，手法のバリエーションも多く，タンパク質に限っても，例えば，一つ一つのタンパク質を変性条件で分離するsodium dodecyl sulfate（SDS）- polyacrylamide gel electrophoresis（PAGE），タンパク質複合体をその機能や構造を保ったまま分離するblue-native（BN）-PAGEやclear-native（CN）-PAGEなど, 様々な目的に使われている．

連絡先
高林　厚史
北海道大学低温科学研究所
〒 060-0819 北海道札幌市北区北 19 条西 8 丁目
Tel: 011-706- 5469
Email: takabayashi@lowtem.hokudai.ac.jp

1）北海道大学低温科学研究所
Institute of Low Temperature Science, Hokkaido University, Sapporo, Japan

本稿では，タンパク質の電気泳動にフォーカスを当て，その原理や歴史，buffer系の違いなどを解説する．

2. タンパク質電気泳動において考慮すべきいくつかのこと

2.1. タンパク質の表面への負電荷の付与方法の選択

核酸は文字通り「酸」であるためbuffer中で負に荷電する．しかし，タンパク質の表面電荷はタンパク質のアミノ酸組成によって大きく異なる．つまり，泳動条件においてタンパク質は1）正に荷電するもの，2）ニュートラルなもの，3）負に荷電するもの，の3種類に分かれる．そのため，泳動時にタンパク質を負に荷電させるための工夫が必要になる．そして，その方法は大きく2つに分けられる．アルカリ性の泳動bufferを用いる方法と負電荷を持つ分子をタンパク質に結合する方法である．

アルカリ性の泳動bufferを用いることのメリットは負電荷を持つ分子をタンパク質と結合させる必要がないことであり，安価で，かつ，プロトコールも簡単である．実際，古典的なNative-PAGEの系ではアルカリ性のbuffer条件でSDSを加えずにタンパク質を分離していた．ただし，この手法には大きな問題点が3つある．１つは全てのタンパク質（複合体）を負に荷電させることは実際にはできないこと，またアルカリ性で変性するタンパク質（複合体）もめずらしくないこと，さらには泳動度と分子量が大きくずれること，である．そのため，その適用範囲は限られていた．

そのため，現在では，負電荷を持つ化合物をタンパク質に結合させた後に泳動する方法が主流である．特に有名な手法はSDS-PAGEである．SDS-PAGEにおいては負電荷を持つSDSをタンパク質に結合させることでタンパク質を負に荷電させ，電気泳動を可能にする．他方，BN-PAGEやCN-PAGEなどの現在主流のNative-PAGEではCBBやDOC（sodium deoxycholate）などの（変性作用をほとんど持たないが）負電荷を持つ化合物をタンパク質（複合体）の表面に結合させることで電気泳動を可能にする．この手法においてもCBBやDOCの結合量はタンパク質の分子量とよく相関すると考えられている．しかも興味深いことにタンパク質複合体の泳動度と分子量は強い正の相関を示す．このことはタンパク質複合体においては，高次構造よりも表面電荷の方が，泳動度への影響が大きいことを示唆している．また執筆者らは両親媒性ポリマーのamphipolの1つであるA8−35を用いたCN-PAGEのbuffer系を開発した．これについては後述する．

2.2. ゲルマトリックスの選択

電気泳動においては荷電した生体分子が高分子のハイドロゲルの中を通過する際に，その生体分子の大きさごとにゲル内の移動度が異なる「分子篩い分け効果（molecular sieve effect）」が生じ，分子量に応じて生体分子を分離することができる．これは核酸においてもタンパク質においても同様である．しかし，タンパク質は一般的に核酸よりも小さいため，核酸の分離で主に用いられるアガロースはほとんど使われない．その代わりに主にポリアクリルアミドゲルが用いられる．

ポリアクリルアミドゲルはアクリルアミドとその架橋剤であるビスアクリルアミドを混合しAPSとTEMEDを加えて重合反応を開始することで作成される．アクリルアミドの濃度が低いほど大きなタンパク質の分離に優れ，逆に言えば濃度が高いほど小さいタンパク質の分離に優れる．また，アクリルアミドとビスアクリルアミドの比率も泳動度に影響し，一般的にはビスアクリルアミドの比率が高いほどより小さなタンパク質の分離に優れる．ただし，例外的に，ビスアクリルアミドの比率を「極端に」高くすることで逆にゲルのポアサイズを大きくし，非常に大きなタンパク質複合体の分離を可能にするlarge-pore BN（もしくはCN）-PAGEとよばれるnative-PAGE法も開発されている（Strecker et al., 2010）．

SDS-PAGEにおいては単一濃度のポリアクリルアミドゲルが広く用いられているが，native-PAGEにおいてはリニアグラジエントゲルが主流である．例えば，BN-PAGEやCN-PAGEでよく用いられる4-13%のゲルでは数十kDaから数千kDaのタンパク質複合体を分離できる．また，SDS-PAGEにおいてもリニアグラジエントゲルを用いることで広範囲の分子量のタンパク質を高い分離能で分離できる．リニアグラジエントゲルは自作できるが，手間も時間もかかるため，SDS-PAGEにおいては市販のゲルを購入することも多い．一方で，BN-PAGEやCN-PAGEのゲルを販売するメーカーは限られており，またゲル濃度も限られているため，ゲルを自作する研究者の方が多いのではないかと推測される．

2.3. 膜タンパク質の可溶化の際の界面活性剤の選択

膜タンパク質の可溶化はとりわけnative-PAGEにおける大きな課題である．まずSDS-PAGEにおいては強力な可溶化力を持つSDSを用いて膜タンパク質を生体膜から可溶化することで，多くのケースでは高効率でタンパク質を可溶化できる．つまり，SDS-PAGEにおいてSDSは可溶化とタンパク質への負電荷の付与と2つの役割を持つ．一方で

SDSは強力な変性剤であるため，native-PAGEでは使用できない．

Native-PAGEで最も広く用いられている界面活性剤はdodecylmaltoside（DDM）である（Choy et al., 2021）．これには光学異性体であるα-DDMとβ-DDMがあり，いずれもよく用いられる．共通する性質として，非イオン性の界面活性剤であり，変性作用が小さいマイルドな界面活性剤ではあるものの，膜からのタンパク質の可溶化力も比較的強い．古くから用いられてきたのはβ-DDMであり，α-DDMよりも安価であることもあって現在でもよく用いられている．一般的にはα-DDMはβ-DDMよりもより変性作用が小さい傾向があると考えられており（Kotov et al., 2019; Pagliano et al., 2012），それに期待してα-DDMを選択することも増えてきている．また最近ではDDMとcholesteryl hemisuccinate（CHS）の混合液を用いた可溶化も増えている（Choy et al., 2021）．

また，より変性作用の小さい界面活性剤として，digitonin/GDNも用いられている（Choy et al., 2021）．Digitoninは植物由来のマイルドな界面活性剤で，PSI-LHCI-LHCIIやPSI-PSII megacomplexなど，DDMを用いた可溶化では解離してしまうような壊れやすい複合体の構造を維持したまま可溶化することができる（Järvi et al., 2011）．ただし，いくつかの欠点を抱えており，使いづらい界面活性剤でもある．まず，天然由来であるため，メーカーやロットによる品質や純度の差が大きい．次に，水に溶けづらく，一旦溶けても不溶化することもあるため扱いづらい．そこで，最近になって用いられるようになったのがdigitoninの構造アナログであるGlyco-diosgenin（GDN）である．これは水に溶けやすく，しかも天然由来ではないため品質も安定している．これによりdigitoninの使いづらさは解消されたといえる．ただし，両者ともにDDMと比べると可溶化力が低く，特にPSIIが局在するgrana coreの可溶化に難があることには注意が必要である．なお，それを逆手にとって，digitonin/GDNを用いた選択的な可溶化により，grana core，grana margin，stroma lamellaeの分画をする手法もよく用いられている（Koochak et al., 2019; Nishioka et al., 2021; Yokoyama et al., 2016）．また，DDMと同様にCHSとの組み合わせもよく用いられる．

3. 電気泳動のbuffer系の原理と比較

3.1. LaemmliによるSDS-PAGEの開発とそのbuffer系

もっとも著名な電気泳動のbuffer系は間違いなくLaemmliのbuffer系であろう（Laemmli, 1970）．このbuffer系は1970年に報告され，現在でも広く用いられている．SDS-PAGEの特徴は界面活性剤のSDSにある．まず，電気泳動の課題の一つは膜タンパク質の可溶化である．その可溶化には主に界面活性剤を用いることになるが，特に強い可溶化力を持つのがSDSである．そのため，SDS-PAGEにおいては生体膜に局在するタンパク質も可溶化し，分離することができる．これがSDSを用いることの1つ目の利点である．

次に，電気泳動においてはタンパク質の表面電荷が問題になる．「酸」であり水溶液中で負電荷を持つDNAやRNAと異なり，タンパク質を構成するアミノ酸のpKaはアミノ酸ごとに大きく異なるため，中性～弱アルカリ性のbuffer中でタンパク質が負電荷を持つかどうかはタンパク質によって異なる．電荷を持たないタンパク質は電気泳動ができないため，負電荷を持たせる工夫が必要になる．SDS-PAGEでは負電荷を持つSDSがタンパク質に比較的均一に結合し，SDSとタンパク質の複合体として分離される．そしてその複合体は負電荷を持つことになり，タンパク質の表面電荷によらず分離が可能になる．

さらに，タンパク質の電気泳動ではその立体構造も問題になる．同じ分子量のタンパク質であっても立体構造によってゲル内での移動速度は異なり，結果として泳動後の移動度が分子量とずれてしまうからである．そしてここでもSDSは重要な働きを持つ．SDSは強力なタンパク質変性作用を持ち，還元剤および熱処理との組み合わせにより，タンパク質間の相互作用を切断し，タンパク質の立体構造を壊すことができる．

つまり，SDSはタンパク質の可溶化，負電荷の付与，立体構造の破壊という3つの機能を持つ界面活性剤であり，一石三鳥の効果がある．これがSDS-PAGEが長年にわたり最も広く用いられる理由と考えられる．

次にLaemmliのbuffer系に注目したい．そのbuffer系ではbuffering ionにTris，leading ionとしてCl^-，trailing ionとしてglycineが用いられている．特に注目すべきはglycineである．Glycineは安価ではあるもののtrailing ionとしては移動度が遅い．これはLaemmliのSDS-PAGEで低分子量（< 20kDa）のタンパク質の分離が悪い原因の１つである（Schägger and von Jagow, 1987）．また，glycineは中性では電荷が釣り合ってしまいtrailing ionとしては機能しない．これはLaemmliの系がアルカリ性のbufferを用いる理由である．ただし，中性のbuffer系で分離することにはメリットがあり，例えばゲルの保存性が良くなり，泳動時のタンパク質の修飾が減ること，などが指摘されている．そのため，SDS-PAGEの改変buffer系ではこのglycineの置き換えが行われることが多い．

ただし，trailing ionとしてglycineを用いることには安価であること以外にもメリットがある．それは，stacking gel（濃縮ゲル）を作成できることである．詳しくは市販のマニュアルを参照いただきたいが，濃縮ゲルではゲル内のpHを弱酸性にしてglycineの電荷をニュートラルにする．それによりglycineの移動度をタンパク質よりも遅らせることでタンパク質をleading ionであるCl^-とglycineで挟み込む．それにより，局所的な高電圧を形成し，サンプルを濃縮している．この濃縮ゲルを利用できるのはtrailing ionとしてglycineを選ぶことのメリットであり，他のbuffer系では濃縮ゲルは利用できない．

まとめると，LaemmliのSDS-PAGEは最もよく用いられる電気泳動法であるもののtrailing ionとしてglycineを用いたことには問題点もあり，現在では特に低分子量（< 20kDa）のタンパク質の分離の向上が必要な場合には他のtrailing ionを用いた系が利用されることも増えつつある．次はそれらについて紹介する．

3.2. SDS-PAGEの改変buffer系

LaemmliのSDS-PAGEのbuffer系の最大の課題はおそらく低分子量のタンパク質の分離能が悪いことである．そして，その原因は先述のようにtrailing ionにある．逆に言えば，glycineよりも速いtrailing ionを用いることでその改善が可能である．なかでも最も有名な改善系がTris-Tricine-SDS-PAGEである（Schägger and von Jagow, 1987）．この系ではtrailing ionとしてTricineを用い，buffering ionにはLaemmliと同様にTrisを用いている．この系はSchäggerらによって開発され，低分子量のタンパク質の分離に長く利用されてきた．SchäggerはBN-PAGEやCN-PAGEの開発者でもあるが，これについては後述する．

また，最近ではbuffering ionとしてBisTrisを利用し，trailing ionとしてMESやMOPSを用いたBisTris-SDS-PAGE系が，Invitrogen社（現ThermoFisher Scientific社）で開発され，NuPAGE Bis-Tris gelという製品名で同社から販売されている．この系は低分子量タンパク質の分離に優れるだけでなく，中性でタンパク質を分離できることで泳動の際のタンパク質の修飾が低減できるなどの利点があるとのことである．

このようにglycine以外のtrailing ionを選ぶことで低分子量のタンパク質の分離を向上させるとともに，中性域での分離が可能になる．ただし，濃縮ゲルが作成できないことに加えて，ランニングコストが上がるなどの欠点もあり，目的に応じて使い分けることが好ましい．

3.3. BN-PAGEのbuffer系

古典的なnative-PAGEはSDSを使わないSDS-PAGEとも言えるものであり，分離能に課題があり，またアルカリ性のbufferでの分離により，構造や機能を失ってしまうタンパク質複合体も多かったと思われる．その状況を一変させたのがBN-PAGE（Schägger and von Jagow, 1991）の登場であった．BN-PAGEは多くのタンパク質複合体の機能や構造を維持したまま分離することができ，しかもその分離能は従来のNative-PAGEと比べてとても高い．このBN-PAGEの開発者がTricine-SDS-PAGEと同じSchäggerらであることは注目に値する．実際，BN-PAGEのbuffer系はTricine-SDS-PAGEとの共通点が多いのである．ここからは具体的にBN-PAGEのbuffer系を見ていきたい．まず，buffering ionはBisTrisもしくはimidazole（Wittig et al., 2006）であり，bufferのpHは7.0と中性である．この点はTrisをbuffering ionとし，アルカリ性のpHで分離するTricine-SDS-PAGEとは異なる．一方で，trailing ionはTricineであり，Tricine-SDS-PAGEと同じである．これらの点でBN-PAGEのbuffer系はTricine-SDS-PAGEを中性で泳動できるようにした，いわば改変版と言える．

では，Schäggerらは，SDSを使わずにどのようにしてタンパク質複合体に負電荷を付与したのだろうか？その秘密が名前にある．青色の色素であるCBBの利用である．CBB R-250は水に溶けにくいが，CBB G-250は水に溶ける．また，CBBは水溶液中で負電荷を持つ．つまり，CBB G-250をタンパク質複合体に結合させることで，タンパク質複合体の表面に負電荷を供与することが可能になり，泳動することができるようになるのである．しかも，Bradford法というCBBを用いたタンパク質の比色定量法があるように，CBBはタンパク質複合体に対して比較的一様に結合する．そのため，BN-PAGEではタンパク質複合体の分子量に応じてCBBが結合し，それにより，タンパク質複合体は分子量に応じて分離される．これがBN-PAGEではタンパク質複合体の分離能がよい理由である．

では，CBBの結合はタンパク質複合体にどのような影響があるのだろうか．著者らによれば，一般的に，CBBの結合はタンパク質複合体間の相互作用を壊すことはなく，むしろ強める働きさえあるとのことである（Schägger and von Jagow, 1991）．この主張はこれまでの先行研究で多くのタンパク質複合体がBN-PAGEで分離できたことを考えると，それなりに妥当なのではないかと考えられる．ただし，青色のCBBは分光学的な解析や色素解析などを妨害するため，例えば光合成タンパク質複合体の解析には邪魔であることは間違いない．これを改善したのが次のCN-PAGEである．

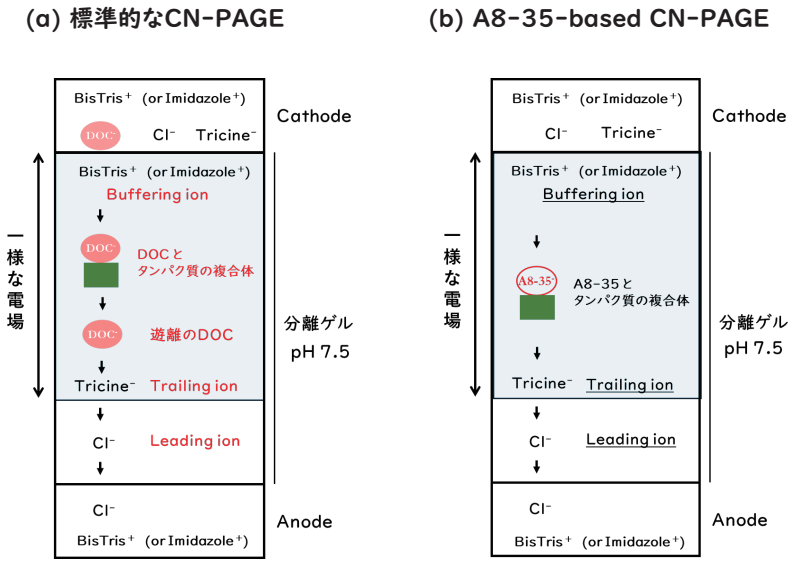

図1：標準的なCN-PAGEとamphipol A8-35を用いたCN-PAGEのbuffer系の比較
標準的なCN-PAGE（Schägger et al. 1994）は，buffering ionにBisTris（もしくはImidazole），trailing ionにTricine，タンパク質複合体に負電荷を付与するための化合物には無色透明なDOCを用いたbuffer系である．Cathodeバッファーには十分な量のTricineとDOCが含まれており，これらは電気泳動中，陰極から陽極へと継続的に移動し続ける．この過程で，Tricineはタンパク質やDOCよりも速く移動し，均一な電場の形成に重要な役割を果たす．図中ではTricineのフロントのみが示されているが，実際にはフロントからCathodeまで全体に分布していると考えられる．DOCもまたタンパク質よりも速く移動し，タンパク質複合体とDOCの結合は一時的なものであり，泳動中は結合と解離を繰り返しながらゲル内を移動する．そのため，遊離状態のDOCもフロントからCathodeまで全体に分布していると考えられる．
　筆者らの開発したamphipol A8-35を用いたCN-PAGE（Kameo et al. 2021）のbuffer系はほぼ標準的なCN-PAGEと変わらない．DOCの代わりにamphipol A8-35を用いた点が最も大きな点である．なお，A8-35とタンパク質複合体の結合は泳動中に離れないほどに強いため，cathode buffer にA8-35を加える必要はなかった．A8-35は高価な試薬であるため，この発見はランニングコストを劇的に下げることに繋がった．

3.4. CN-PAGEのbuffer系

BN-PAGEの課題として青色のCBBが下流の実験を妨害する事が挙げられた．それを解決したのは，やはり，Schäggerらである（Schägger et al., 1994）．彼らは，無色透明でタンパク質複合体に結合し，しかもタンパク質複合体への変性作用が小さい化合物としてDOCに着目した．陰イオン性の界面活性剤であり，胆汁酸の成分でもあるDOCはまさに先ほどの条件を充たす化合物なのである．この泳動系は最初Colorless-Native-PAGEと名付けられたが，その後に著者らによってClear-Native-PAGEと改名された．いずれにせよ略称はCN-PAGEである．

CN-PAGEのbuffer系はBN-PAGEと全く同じであり，ただ，CBBがDOCに代わっただけである．おそらく多くの場合，泳動パターンもよく似たものになるが，著者らの経験では，DOCの方がタンパク質複合体は少し解離しやすい傾向にあるのかもしれない．ただ，特に分光学的な解析や色素解析が重要な光合成研究者にとってはCN-PAGEの方がよく利用されている．

3.5. 筆者らによるCN-PAGEのbuffer系の改良

CN-PAGEは光化学系の分離のための優れた実験系であるものの，泳動中にPSII-LHCIIからLHCIIや酸素発生系（OEC）が解離するという課題も抱えていた．その課題を解決するために，筆者らは2つのアプローチを取った．1つはDOCよりも変性作用の小さな化合物を探索すること，もう1つは弱酸性のbuffer系を確立することである．2つのアプローチともに論文としてまとめることができたため，ここではそれについて紹介したい．

まず前者についてはDOCの変成作用によるものではないかと考えDOCの代替の化合物を探した．そして，両親媒性ポリマーのamphipol類に着目した．Amphipol類は結晶構造解析などで用いられるようになっており，一般的に膜タンパク質は界面活性剤ミセル中よりもamphipol類との複合体中の方が安定であると考えられている．そして，広く利用されているamphipol A8-35は水溶液中で負電荷を持つ．そのためこのA8-35をDOCの代わりに用いれば，より安定に光化学系を分離できるのではないかと考えた．

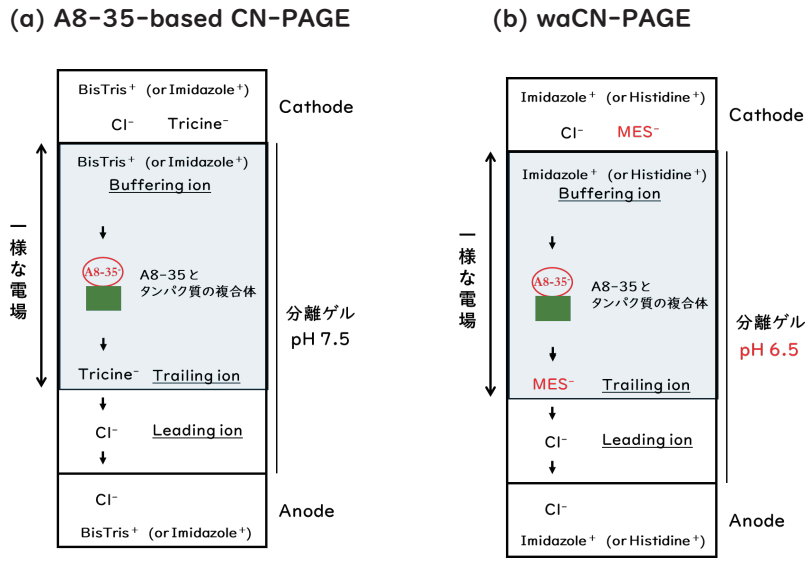

図2：（Amphipol A8-35を用いたCN-PAGEとwaCN-PAGEのbuffer系の比較
A8-35を用いたCN-PAGEはPSII-LHCIIからのLHCIIの解離を効果的に抑制することができた．しかし，PSII-LHCIIからの酸素発生複合体（OEC）の解離を防ぐことはできなかった．そこで，筆者らは可溶化および泳動時のpHを弱酸性にしたbuffer系を開発した（waCN-PAGE）．この系ではpH6 .5でのpKaを考慮して，buffering ionをBisTrisもしくはHistidineとし，trailing ionとしてMESを選択した．また，DOCはこのpHでは不溶化するため利用できない．そのため，waCN-PAGEではA8-35を利用する必要がある．
　waCN-PAGEではOECを保持したままPSII-LHCIIを分離することに成功した（Matsumae et al. 2022）．自分の知る限り，waCN-PAGEはOECを保持したままPSII-LHCIIを分離することのできる唯一のnative-PAGEである．ただし，これまでのbuffer系のCN-PAGEと比べると，泳動時間が長くかかる（Histidineで約2倍，BisTrisで約4倍）ため，筆者自身も必要に応じて使い分けている．

実際にA8-35を用いたCN-PAGEを試したところ，期待通り，DOCを用いた従来のCN-PAGEよりもPSII-LHCIIからのLHCIIの解離を防ぐことができた．また，A8-35は高価な化合物ではあるが，A8-35とタンパク質複合体との結合は強く，泳動中に解離しないことが明らかになった．そのため，cathode bufferにA8-35を添加する必要はなく，ロードするサンプルにのみ添加すればいいことも明らかになった．これによりランニングコストを劇的に低下させることができた．この実験系については2021年に報告することができた（Kameo et al., 2021）（図1）．

次にOECの解離については先行研究から，弱アルカリ性の条件でPSIIを可溶化するとOECがPSIIから解離するが，弱酸性ではその解離を劇的に抑制できることが明らかになっていた．CN-PAGEではpH7.0のbufferを用いるが泳動中のゲルのpHは7.5であると報告されており，この弱アルカリ性での分離が問題なのではないかと考えていた．そのため，弱酸性（pH 6.5）で分離できるCN-PAGEのbuffer系の開発に取り組んだ．そして，trailing ionをMESとし，buffering ionをhistidineもしくはBisTrisとすることで可能とした．実際に泳動すると，期待通り，OECを保持したままでPSIIを分離することに成功した．なお，この系ではDOCを用いることはできない．DOCのpKaは6.5に近く不溶化してしまうためである．このbuffer系でCBBを利用したBN-PAGEを行うことはできるものの，実際に泳動するとPSIIからOECは解離してしまった．つまり，PSIIからのOECの解離を防ぐためには，弱酸性のbuffer系とamphipol A8-35の両方が必要らしい．つまり，私たちの実験系はPSIIにOECを保持したまま分離できる唯一のnative-PAGEである．この実験系については2022年に論文として報告することができた（Matsumae et al., 2022）（図2および図3）．

ただし，現時点では弱酸性のbuffer系を用いたCN-PAGEは通常のbuffer系のCN-PAGEよりも分離に必要な時間が長くかかる（histidineの系でおよそ2倍，BisTrisの系でおよそ4倍）．そのため，筆者らの研究室では普段はA8-35を用いた通常のbuffer系でのCN-PAGEを行うことが多い．いずれこの欠点も改善できればと願っている．

4. まとめ

ここまでbuffer系の変遷を中心に，駆け足で，SDS-PAGEとnative-PAGEの開発の歴史をみてきた．電気泳動，特にnative-PAGEは分離後もタンパク質複合体の機能や構造が

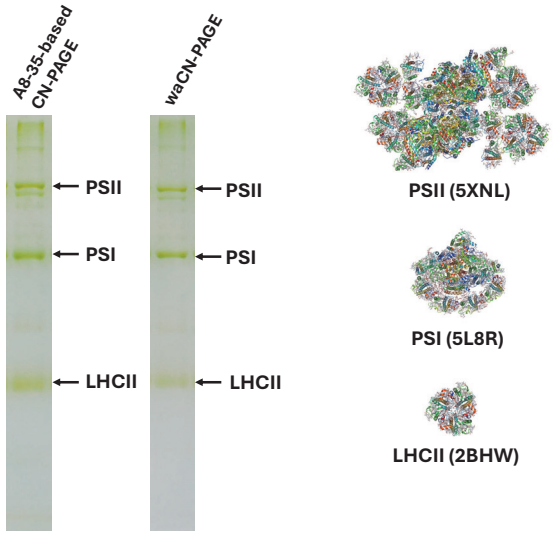

図3：A8-35を用いたCN-PAGEとwaCN-PAGE
A8-35を用いたCN-PAGEとwaCN-PAGEで（目で見える）バンドパターンはほとんど変わらない．ただし，2D-CN/SDS-PAGE後に銀染色やウエスタン解析を行うと，waCN-PAGEでは1）PSIIからのPsbPの解離が見られず，2）ATP合成酵素のサブユニット解離も見られない，の2つの利点があることが明らかになっている（Matsumae et al. 2022）．

維持されているため，様々な応用が可能である．現行のnative-PAGEは非常に洗練されており，筆者らも日常的に利用しているが，native-PAGEではほぼ必須のグラジエントゲルの作成が難しいこと，また分離後のタンパク質をゲルから取り出すが難しいこと，などの課題もある．これらの課題についても現在取り組んでおり近い将来にその報告ができればと願っている．

参考文献

Choy, B.C., Cater, R.J., Mancia, F., and Pryor, E.E., Jr (2021) A 10-year meta-analysis of membrane protein structural biology: Detergents, membrane mimetics, and structure determination techniques. *Biochim Biophys Acta Biomembr.* 1863: 183533.

Järvi, S., Suorsa, M., Paakkarinen, V., and Aro, E.-M. (2011) Optimized native gel systems for separation of thylakoid protein complexes: novel super- and mega-complexes. *Biochem J*. 439: 207–214.

Kameo, S., Aso, M., Furukawa, R., Matsumae, R., Yokono, M., Fujita, T., et al. (2021) Substitution of Deoxycholate with the Amphiphilic Polymer Amphipol A8-35 Improves the Stability of Large Protein Complexes during Native Electrophoresis. *Plant Cell Physiol*. 62: 348–355.

Koochak, H., Puthiyaveetil, S., Mullendore, D.L., Li, M., and Kirchhoff, H. (2019) The structural and functional domains of plant thylakoid membranes. *Plant J.* 97: 412–429.

Kotov, V., Bartels, K., Veith, K., Josts, I., Subhramanyam, U.K.T., Günther, C., et al. (2019) High-throughput stability screening for detergent-solubilized membrane proteins. *Sci Rep*. 9: 10379.

Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227: 680–685.

Matsumae, R., Kameo, S., Tanaka, R., and Takabayashi, A. (2022) Letter to the editor: Weak-acidic clear-native polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of the intact forms of thylakoid protein complexes. Plant Cell Physiol. 63: 883–885.

Nishioka, K., Kato, Y., Ozawa, S.-I., Takahashi, Y., and Sakamoto, W. (2021) Phos-tag-based approach to study protein phosphorylation in the thylakoid membrane. *Photosynth Res*. 147: 107–124.

Pagliano, C., Barera, S., Chimirri, F., Saracco, G., and Barber, J. (2012) Comparison of the α and β isomeric forms of the detergent n-dodecyl-D-maltoside for solubilizing photosynthetic complexes from pea thylakoid membranes. *Biochim Biophys Acta*. 1817: 1506–1515.

Schägger, H., Cramer, W.A., and von Jagow, G. (1994) Analysis of molecular masses and oligomeric states of protein complexes by blue native electrophoresis and isolation of membrane protein complexes by two-dimensional native electrophoresis. *Anal Biochem*. 217: 220–230.

Schägger, H., and von Jagow, G. (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem*. 166: 368–379.

Schägger, H., and von Jagow, G. (1991) Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal Biochem*. 199: 223–231.

Strecker, V., Wumaier, Z., Wittig, I., and Schägger, H. (2010) Large pore gels to separate mega protein complexes larger than 10 MDa by blue native electrophoresis: isolation of putative respiratory strings or patches. *Proteomics*. 10: 3379–3387.

Wittig, I., Braun, H.-P., and Schägger, H. (2006) Blue native PAGE. *Nat Protoc*. 1: 418–428.

Yokoyama, R., Yamamoto, H., Kondo, M., Takeda, S., Ifuku, K., Fukao, Y., et al. (2016) Grana-localized proteins, RIQ1 and RIQ2, affect the organization of light-harvesting complex II and Grana stacking in Arabidopsis. *Plant Cell*. 28: 2261–2275.