

葉緑体ストロマ画分の二次元電気泳動

加藤 由佳子

技術部先端技術支援室

はじめに

植物は、光エネルギーと水、二酸化炭素を用いて、光合成により自らエネルギーを作り出すことができる。その光合成を行なっているのが葉緑体である。葉緑体は、二重膜に覆われていて、その中にチラコイド膜という膜構造と基質となっているストロマが存在する。このストロマ中のタンパク質について、二次元電気泳動法（詳しくは後述する）による研究を行うことになった。二次元電気泳動は様々な要素が絡み合い、サンプルにより微妙に条件を変えなければ、きれいな泳動像を得られない。葉緑体ストロマ画分についての二次元電気泳動の諸条件について検討を行ったので報告する。

二次元電気泳動

今回は、タンパク質の持つ電荷によって分離させる等電点電気泳動を一次元目に、タンパク質の大きさ（分子量）によって分離させる SDS-PAGE（Sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis）を二次元目に行なう（図 1）ことによって、ストロマ画分に存在するタンパク質を分離することを目的とした。

タンパク質は、構成するアミノ酸が持つ電荷によって、それ自身も電荷を持っている。等電点電気泳動はその電荷を利用して、タンパク質を分離させる。pH 勾配を持つゲル上で電圧をかけると、それぞれのタンパク質は自身の持つ電荷の値が 0 となる pH で留まる。等電点電気泳動で用いる pH 勾配をもつゲルは乾燥状態で市販されている。また、泳動に関しても、機械によりほぼ自動化されている。等電点電気泳動では、サンプルを添加する方法の違いにより大きく 2 種類の方法がある。サンプル膨潤法では、乾燥したゲルを“戻す”（膨潤させる）時に、膨潤液と一緒にサンプルもゲルに染み込ませることでサンプルを添加する。カップローディング法では、乾燥ゲルを膨潤させた後に、サンプルを染み込ませた濾紙から電圧をかけてサンプルをゲル上へ移行させることで添加する。どちらの方法も短所と長所がある（表 1）が、生物適応分野ではすでにサンプル膨潤法での等電点電気泳動用機器 IPGphor III（GE ヘルスケア社）を購入していたことから、サンプル膨潤法での分離を試みた。

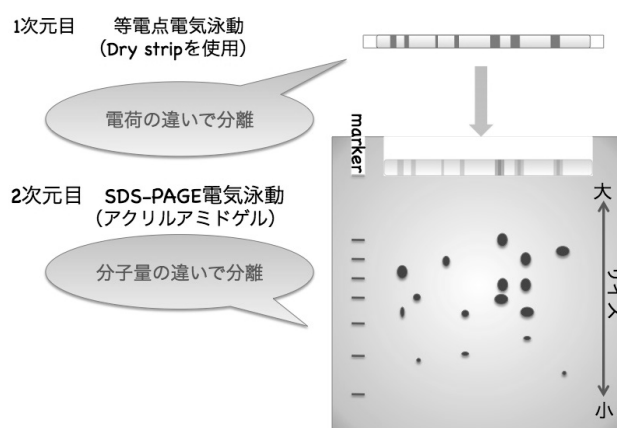


図 1 二次元電気泳動。今回は一次元目に等電点電気泳動、二次元目に SDS-PAGE を行なった。

表 1 サンプル膨潤法とカップローディング法の比較。

	長所	短所
サンプル膨潤法	扱いやすい。 より多くのタンパク質を添加できる。	塩基性物質の影響を受けやすい。
カップローディング法	サンプル中の塩類等の影響を受けにくい。 アルカリ側でも良好な泳動像。	高濃度で沈殿が生じることがある。

表にも示した通り、サンプル膨潤法では、サンプルに夾雑物が多く入っていると泳動が乱れることが知られている。そのため、サンプル添加前のサンプルの調製が重要なステップとなる。また、等電点電気泳動では、泳動中に目視による泳動状態の確認が出来ないので、泳動条件の検討も必要となる。

SDS-PAGE では、立体構造や平面構造を取っていたタンパク質が SDS によって変性し、さらに表面に SDS のマイナスの電荷を帯びる。その状態で網目状のアクリルアミドゲルを通し、分子量による移動度の差でタンパク質を分離する。アクリルアミドの濃度を変えることで、タンパク質のサイズによる分離状態を変えることができる (図 2)。

以上を踏まえて、今回は (1) 等電点電気泳動の泳動条件、(2) SDS-PAGE のアクリルアミドゲル濃度、(3) サンプルの調製方法、の 3 項目について主に述べる。

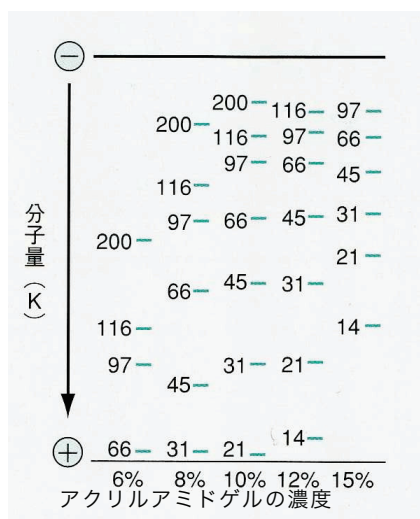


図 2 SDS-PAGE のアクリルアミドゲル濃度とマーカータンパク質の泳動度 (『改訂 タンパク質実験ノート』から抜粋)。

等電点電気泳動の泳動条件の検討

シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) の葉を、特殊なミキサー (田中、2008) を用いて浸透圧を葉緑体と等張に合わせたバッファー中で破碎し、遠心によって沈殿を得た後、パーコール密度勾配遠心分離によって無傷葉緑体 (壊れていない葉緑体) を単離した。得られた葉緑体を低張液によって破碎し、ショ糖密度勾配超遠心分離を行なって上清のストロマ画分を得た。このストロマ画分について、等電点電気泳動の泳動条件を検討した。

表 2 等電点電気泳動の泳動条件。メーカー推奨条件と検討した条件について記した。

(steps)	条件1		条件2		条件3	
	電圧(V)	time (hr:min)	電圧(V)	time (hr:min)	電圧(V)	time (hr:min)
step and hold	500	1:00	500	1:30	500	4:00
gradient	1000	1:00	3500	4:30	1000	1:00
gradient	6000	2:30			6000	2:30
step and hold	6000	0:10-0:50	3500	8:00	6000	1:40

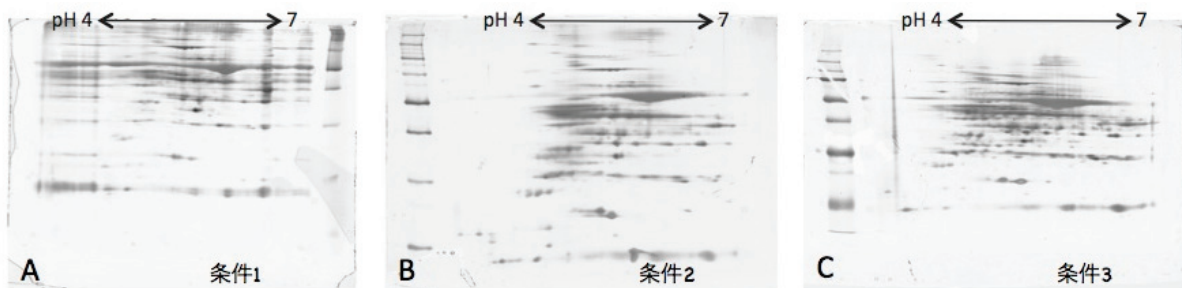


図 3 等電点電気泳動の条件の比較。条件 3 (total 20 kVhr) で良い泳動像が得られた。

今回用いた等電点電気泳動用のゲルストリップ (pH4-7、長さ 11 cm) の場合、メーカー推奨の泳動条件は表 2 の条件 1 (total 15 kVhr) のようになる。しかしながら、実際にこの条件で葉緑体ストロマ画分の等電点電気泳動を行なうと、泳動が不十分で二次元電気泳動後、図 3A のように横方向に筋が観られた。一方、条件 2 (total 37.75 kVhr) のように、合計電圧を高くしても、改善されなかった (図 3B)。そこで、条件 3 (total 21.5 kVhr) のように、最初の低電圧での泳動を長くし (荷電物質がゲルストリップの外に移動する)、最後の高電圧での泳動を長くすることで図 3C のように、多少改善されたので、この条件で行なうこととした。

アクリルアミドゲル濃度の検討

図 2 からわかるように、12%アクリルアミドゲルでの泳動を行なうと、幅広いサイズのタンパク質を分離することができる。しかしながら、実際に行なってみると、14%アクリルアミドゲルで分離がよかった。一方で、泳動前線がゲルの下端に到達するまで泳動しても、ストロマタンパク質はゲルの上半分程度にしか存在しなかった。そこで、マーカの泳動状態を確認しながら、泳動時間を長くして、ゲルの下端近くまでストロマタンパク質が分離されるようにした。

サンプルの調製方法の検討

溶液サンプル中のタンパク質の濃縮や脂質・塩などの不純物の除去にはいくつかの方法がある。最初に、タンパク質を沈殿させ、上清に残っている不純物を上清と共に取り除く TCA（トリクロロ酢酸）沈殿法、アセトン沈殿法、キットによる精製法の 3 つの方法について検討した。

TCA 沈殿による方法は、短時間で溶液中ほとんどのタンパク質を濃縮することができる。しかし、TCA は強酸性の劇物であり、アセトン（または冷却エタノール）沈殿により完全に除去されなければ、その後の泳動に影響を与えてしまう。アセトン沈殿だけでもタンパク質サンプルの濃縮・脱塩が可能であるが、アセトン濃度を上げるほどタンパク質は沈殿しやすくなる一方で、上げすぎると塩が析出して脱塩効率が悪くなる。キットによる精製については、GE ヘルスケア社の 2D clean-up kit を用いた（基本は沈殿生成）精製を行なった。2D clean-up kit を用いた精製後のサンプルでは、TCA 沈殿による精製後のサンプルよりは、多少きれいな泳動像が得られたが（図 4）、高分子側のタンパク質の分離の悪さは改善されなかった。

そこで、次に、超遠心分離（約 $400,000 \times g$ 、 4°C 、4 時間）による精製を試みた。この方法では、サンプル中に存在する不溶性物質や高分子の核酸や多糖等を除去することができる。葉緑体中の膜成分等も取り除くことができるので、シヨ糖密度勾配超遠心分離によるストロマ画分の分離を行わず、葉緑体を低張液で破碎後に直接超遠心分離を行なうことにした。また、塩やその他の荷電物質除去およびサンプルの濃縮のため、超遠心分離後はアセトン沈殿または 2D clean-up kit による精製を行なった。サンプル量による泳動像の違いも比較した。その結果を図 5 に示した。超遠心分離により泳動像がきれいになることが確認できた。また、サンプル量は、 $50\text{--}100 \mu\text{g}$ 程度であれば丸いスポットが得られるが、多すぎると等電点電気泳動で十分に分離せずにテーリングしてしまう（尾を引くようになってしまう）ことがわかった。

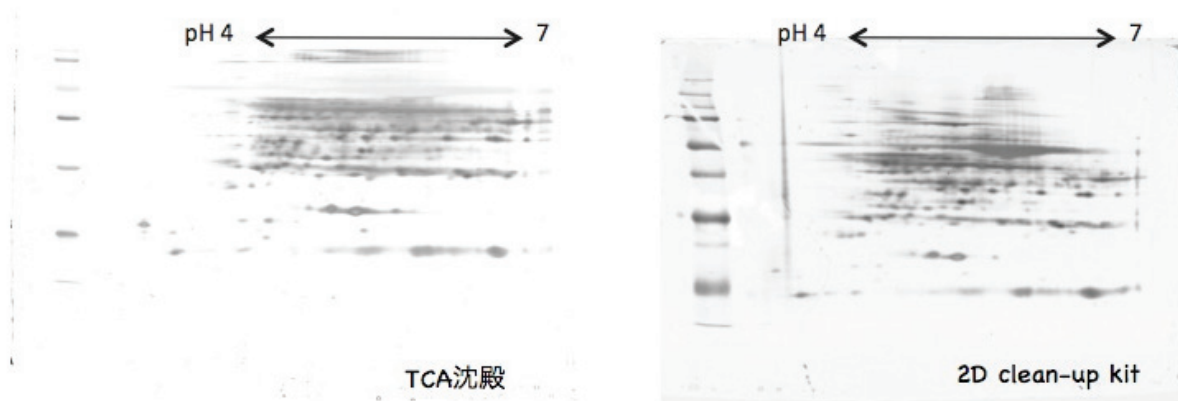


図 4 サンプル精製法の比較。2D clean-up kit を用いると、低分子タンパク質をやや良く分離できた。

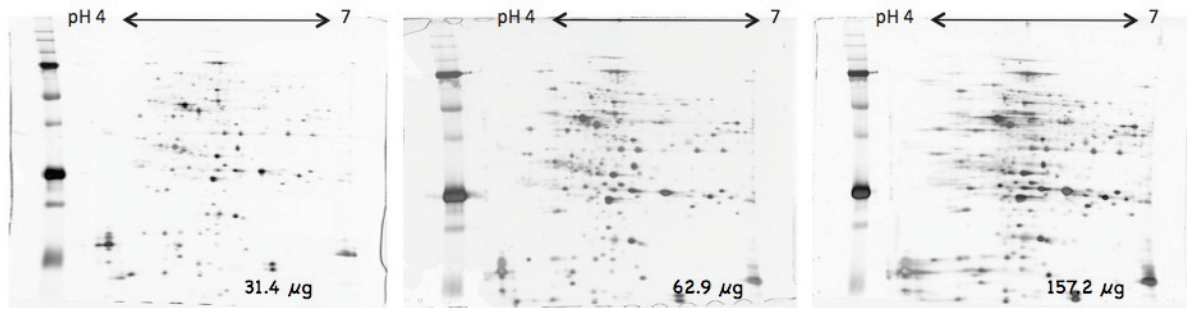


図5 超遠心分離によって精製したストロマトンパク質の二次元電気泳動像。左から 31.4 μg 、62.9 μg 、157.2 μg のサンプルを泳動した。62.9 μg できれいな泳動像が得られた。

まとめ

葉緑体ストロマ画分の二次元電気泳動の諸条件について検討した。サンプルを葉緑体の分取後、超遠心分離とアセトン沈殿（または 2D clean-up kit）によって精製し、50–100 μg 程度を泳動すると、きれいなスポットが得られた。また、一次元目の等電点電気泳動は total 20 kVhr 程度とし、二次元目の SDS-PAGE は 14 %アクリルアミドゲルで、マーカの泳動状態を確認しながら、40 mA の定電流で 4–5 時間程度泳動すれば良いことがわかった。

謝辞

この研究は生物適応分野の皆様にご指導・ご意見を頂きました。また、二次元電気泳動について、微生物生態学分野の笠原准教授、森本さんにも多くのアドバイスを頂きました。心からお礼申し上げます。

参考文献

田中亮一、田中歩 「高等植物の葉緑体に置けるプロテアーゼの研究」北海道大学低温科学研究部技術報告、**13**、1–2、2008年3月。

岡田雅人、宮崎香 編 「改訂 タンパク質実験ノート（下）分離同定から一次構造の決定まで」羊土社、p16、1999年10月。