

ゲノム世代のタンパク質複合体解析

北海道大学 低温科学研究所
高林 厚史*

1. はじめに

筆者は4回生として研究室に所属して以来、タンパク質複合体の解析に携わってきた。振り返ってみると、LC-MS/MS解析がこの分野に及ぼした影響は大きいと改めて感じている。

LC-MS/MS解析の大きな利点としては、1)サンプルが微量であってもタンパク質が同定できること、2)複数のタンパク質が混ざっているサンプルを解析に用いても、そのタンパク質群の網羅的な同定が可能であること、の2点が挙げられる。

一般にモデル植物は、ゲノムサイズが小さい、ライフサイクルが短い、サイズが小さく栽培が容易、形質転換が容易、近縁種に重要な作物がある、などの利点を持っている。その一方で、生化学的な精製材料には適していないと考えられていた。しかしLC-MS/MS解析が利用できればその欠点は克服可能であるため、タンパク質の複合体解析の分野でも、モデル植物の利点を生かした多角的なアプローチが、より強力なものとなってきた。

タンパク質は1つ1つに個性があり解析のマニュアル化が難しいことから、筆者の世代は諸先輩方と比べると生化学が苦手な印象がある。その一方で、変異株を利用した遺伝学的な解析や分子生物学的な手法/ツール、データベース解析等の利用には積極的である。

本稿の前半では筆者自身の研究を振り返りながら、「ゲノム世代的な」タンパク質複合体解析について考えてみたい。また本稿の後半では、タンパク質複合体解析にとって有用な技術であるBlue Native PAGE (BN-PAGE)の実践的なTipsを紹介する。

2. ゲノム世代のタンパク質複合体解析とは？

ここでは、葉緑体NAD(P)H Dehydrogenase (NDH)複

合体のサブユニット組成を明らかにするための筆者自身の2つのプロジェクトの結果を踏まえて、「ゲノム世代的な」タンパク質複合体解析について考察する。

NDH複合体について

筆者のこれまでの主な研究対象は葉緑体のNDH複合体である。これは葉緑体ゲノムコードの11のサブユニット(ndhA-ndhK)と核ゲノムコードのサブユニット群から構成される巨大な複合体であるが、研究を始めた当時(1997年)には核ゲノムコードのサブユニット群は見つかっておらず、その同定は大きな懸案であった。

C₄植物のアマランサスを用いたNDH複合体の分離・精製(1999年~2003年)

まず葉緑体単離と材料の入手が容易なホウレンソウを材料として、NDH複合体を精製しようと試みた。しかし、予備実験の結果、N末端解析に十分な量を確保するのが難しいと判断した。そこで、実験材料を変えることにした。

NDH複合体の蓄積量はC₄植物で多いことが知られている¹⁾。筆者はC₄植物の中でも葉肉細胞でNDHが高蓄積するNAD-ME型植物¹⁾がNDH精製の材料としては理想的ではないかと考えた。そこで目を付けたのがアマランサスである。アマランサスはNAD-ME型のC₄植物であり、葉野菜として市場に出回っているため、精製材料として優れていると判断した。

まず、指導して頂いていた京都大学大学院・遠藤剛先生の車で農協に行き、毎回12kgのアマランサスの葉を購入した。そして研究室に戻るとすぐに葉緑体を単離し、タンパク質精製を試みた。

様々な試行錯誤を行ったが、最終的な実験条件は以下の通りである。まず、マイルドな界面活性剤である

* 連絡先 E-mail: takabayashi@pop.lowtem.hokudai.ac.jp

n-Dodecyl-beta-D-maltoside (DM)でNDH複合体を可溶化し、カラムクロマトグラフィで粗精製した。次に、複合体を Blue-Native PAGE で分離し、nitroblue tetrazolium chloride (NBT)で活性染色を行った。最後に、染色されたバンドを切り出してSDS-PAGEを行った。しかし、銀染色で検出できる程度の量のバンドしか得られず、N末端解析に十分な量を確保できなかった。

もしLC-MS/MS解析が使える環境であれば、同じC₄植物であってもアマランサスではなく、(NADP-ME型であるとはいえ)ゲノム解読が進んでいるトウモロコシを選択しただろう。実際、コーネル大学の研究グループはトウモロコシのプロテオーム解析により、NDH複合体の新規サブユニット群の網羅的な選抜に成功している²⁾。

シロイヌナズナを用いたバイオインフォマティクスによる探索 (2003年~2006年)

この研究を始めたのは博士後期課程3年の秋頃であった。

この頃NDH複合体の未同定サブユニット群を見つけ出すためにバイオインフォマティクスが利用できないかと、論文や本を読んだり、セミナーに出たりしていた。そこで覚えた様々な手法を試してみた結果、1) 系統プロファイル法と2) 共発現プロファイル法が有望であると判断し、その2つの手法で候補遺伝子を絞り込んだ。

系統プロファイル法は、あるタンパク質のオーソログがどの生物種のゲノムで保存され、どの生物種のゲノムで保存されていないかを調べることで、そのタンパク質の機能を推測しようとする手法である。NDH複合体であれば、モデル植物のシロイヌナズナやイネには存在するが、モデル藻類のクラミドモナスやシズンでは失われている。そのため、相同性検索をして、そのような分布になるタンパク質群を探せば良いことになる。

一方、共発現プロファイル法は、発現プロファイルが類似した遺伝子同士はその生理的な機能も関連している可能性が高いことを利用して、未知遺伝子の機能を推測しようとする手法である。特に光合成遺伝子については発現プロファイルと機能の相関が高く、この手法は効果的であった。また候補遺伝子の選抜には、大林武先生(現:東北大)によって作られたATTED-

IIデータベース(<http://atted.jp/>)を利用させて頂いた。

2つの手法で選抜した候補遺伝子群について、T-DNA挿入変異株ラインを入手しNDH活性を測定した結果、幸運にも高確率でNDH活性を失った変異株ラインが存在した。さらに、それらNDH活性を失った変異株を個別に解析した結果、それら変異株の原因遺伝子は、新規なサブユニット群 (NDF1, NDF2, NDF4, NDF5, NDF6, PPL2)をコードしていることが明らかになった³⁻⁶⁾。

この研究はシロイヌナズナのゲノムが完全解読されていること、また公開マイクロアレイデータが蓄積していること、T-DNA挿入変異株が容易に入手できることなど、モデル植物ならではのインフラに大いに助けられた。筆者自身も何らかの形でコミュニティに恩返しをしたいと強く感じている。

ゲノム世代のタンパク質複合体解析とは

ゲノムリソースが充実した植物種においては、LC-MS/MS解析を利用することで、高感度でのタンパク質同定が可能である。N末端解析とLC-MS/MS解析の感度の差は非常に大きく、また、複数のタンパク質を含む粗標品サンプルを用いても網羅的にそのタンパク質群を検出できるため、シロイヌナズナのようなサイズの小さなモデル植物で生化学的な解析を行うことも現実的になった。

事実、筆者は、LC-MS/MS解析の専門家である北海道大学低温科学研究所共同研究推進部の桑野晶喜さん、低温研微生物生態学グループの笠原康裕先生と共同で、シロイヌナズナのチラコイド膜プロテオーム解析を行い、既知のNDHサブユニットの相当数を同定できた。複雑な心境である。

MS解析技術の発展により、モデル植物の利点、例えばゲノムリソースや変異株リソース、遺伝子組み換え技術等、を活かしたタンパク質複合体解析が非常に有効なアプローチになった。バイオインフォマティクスを利用したアプローチはその一例であるといえる。

近い将来、DNAシーケンサーの能力がさらに向上しゲノム解読や大量のEST配列の入手が容易になれば、非モデル植物でもこのようなアプローチが有効となるだろう。

3. BN-PAGEのTipsの紹介



図1 BN-PAGEによりストロマトタンパク質を泳動し、CBB染色したゲル (Str)およびチラコイド膜タンパク質を泳動したゲル (Thy)

Strにおいて、最も量の多いバンドはRubisCOの8量体。Thyにおけるバンドは、上から、光化学系IIの超複合体 (PSII SC)、光化学系IIの二量体 (PSII-D)と光化学系I-LHCI超複合体(PSI-LHCI)の両方を含むバンド、LHCIIの3量体 (LHCII-T)。

BN-PAGEとは

Blue Native PAGE (BN-PAGE) はNativeな構造を保ったままタンパク質複合体を高解像で分離する手法である。CBB G-250をタンパク質に結合させてから泳動するため、通常のNative PAGEと違い、泳動度は分子量にはほぼ比例する。最初はミトコンドリアの呼吸鎖複合体の解析によく用いられたが、最近では光合成研究でもよく用いられる。筆者は10年ほど前から利用しており (図1)、本稿ではその過程で蓄積したTipsを紹介したい。

BN-PAGEのTips

基本的なプロトコル

著者はBN-PAGEの創始者である Schagger のプロトコルを基本的に踏襲している⁷⁾。特に、Nature Protocolsに掲載されたプロトコル⁸⁾は非常に丁寧に書かれた実践的なプロトコルで、初めてBN-PAGEを行う人にもお勧めできる。

Buffer作成

使用するbufferのpHは4°CでpH 7.0になるように調製している。

泳動bufferやゲルbufferでは従来使われていたBis-Trisの代わりにImidazoleが利用可能である⁸⁾。後者の方が安価なので、筆者はそちらを利用している。

また、Cathode bufferにCBBを添加したbufferを作成する際には、CBBを溶液に添加後、室温で2時間以上攪拌し、さらに0.45 μmのフィルターでろ過した後、泳動に用いている。

グラジエントゲルの作成法

筆者は長い針 (テルモスパイラル針 SN-2090)をミニゲル (ATTO AE-6530M) のゲル板の下の方まで差し込み、アクリルアミド濃度が薄い溶液から入れ始め、少しずつ濃くすることでグラジエントゲルを作成している (図2A, B)。アクリルアミド濃度の高い溶液の方が、よりGlycerol濃度が高く比重が重いこともあり、濃度が薄い方の溶液が少しずつ上に浮いていく。濃い溶液から入れ始めて軽い溶液を上に乗せていく手法と比べると、こちらの方が綺麗なグラジエントを形成しやすく、是非お勧めしたい。

なお、グラジエントゲルの作成中にゲルが固まらないためには、ゲル溶液をよく冷やす必要がある。筆者はそれに加えて、低温室でゲルを作成するか、もしくはゲルの作成中はシステム全体、特にグラジエント



図2 BN-PAGEのグラジエントゲルの作成装置

(A) ペリスタポンプの片側のチューブの先をグラジエントメーカーと接続し、ペリスタポンプのもう一方のチューブの先をスパイラル針に接続し、その針の先をゲル板の底に固定している。グラジエントメーカーの中にスターラーバーを入れ、マグネティックスターラーを用いて攪拌している。攪拌時に熱が出るため、グラジエントメーカーは水で冷やしている。

(B) ゲル板に差し込んだスパイラル針の拡大図。針先端のカット面をゲル板の内側に向けている。

メーカーを（マグネティックスターラーが熱源になるため）氷などでよく冷やしている（図2A）。過硫酸アンモニウムの添加量を減らすことで、室温でグラジエントゲルを作成することもおそらく可能と思われるが、筆者自身は試していない。

また、BN-PAGEの後でMS解析を行う場合には、市販の高純度のアクリルアミド溶液を利用してゲルを作成し、室温で一晩以上固めている。

サンプル調整

筆者は、シアノバクテリア、葉緑体、ストロマ、チラコイド膜などのサンプルを泳動している。比較的クルードなサンプルでも泳動可能だが、経験上精製度が高いサンプルの方がトラブルは少ない。クルードなサンプルの場合には特に塩濃度に気をつける（低くする）必要があるが、例えば核酸なども泳動の妨害になる。

膜タンパク質の可溶化にはDMを利用している。典型的には、10 μ g~40 μ g程度のタンパク質サンプル（チラコイド膜であれば、おおよそ 4 μ g~8 μ g chl 相当量）に対して、2% (w/v) のストックを等量加えて5分程度氷上に静置した後、遠心分離し、その上清にCBBストック溶液を加えて泳動に用いている。添加するCBBストック溶液はあらかじめフィルターを過し、4°Cに保存している。なお、可溶性タンパク質（ストロマ画分など）の場合には必ずしもCBBをサンプルに加える必要はない。

サンプルの保存

チラコイド膜についてはよく泳動に用いるため、単離後、小分けして保存している。具体的には、まず遠心して上清を除き、そのペレットを液体窒素で凍らせた後、-80°Cで保存している（~1ヶ月）。その後解凍した後にDMで可溶化し、その後泳動に用いているが、少なくとも光化学系超複合体やNDH複合体などの泳動パターンについては凍結前後での変化は見られない。

電気泳動条件

泳動条件は基本的にはプロトコルに従っているが、サンプル調整に時間がかかる場合にはovernight 泳動も行っている。例えば、50Vの定電圧で10時間程度、低温室で泳動している。個人的には、overnight泳動の

方が、泳動像が綺麗であるように感じている。ただし、この条件では泳動中に電流が 1 mA を下回るため、パワーサプライによってはエラーが出るので注意が必要である。

ゲルをウエスタン解析に用いる場合には、1/3~1/2ほど泳動が進んだ段階でCBB-freeのCathode bufferに交換している。これはCBBがブロッキングを妨害するためである。

泳動後のゲルの保存

泳動後のBN-PAGEのゲルは 50% glycerol 液で平衡化した後、適当量の 50% glycerol 液と一緒にハイブリバッグに入れることで、-80°Cで保存することが可能である。この後で、例えば二次元SDS-PAGEを行っても、凍結保存に伴うバンドの変化は（CBB染色でも銀染色でも）見られない。さらに、このように保存したゲルはMS解析にも利用可能である。

泳動後の実験について

著者は、泳動後のゲルをCBB染色、ウエスタン解析、LC-MS/MS解析、活性染色、二次元SDS-PAGEなどに用いている。BN-PAGE後のタンパク質複合体は構造のみならず、活性を保っていることが多く、これ以外にも様々な利用法が可能であると思われる。

4. おわりに

LC-MS/MSについては機種依存性が大きいため、本稿ではあまり取り上げませんでした。興味を持たれた方は、例えば「明日を拓く新次元プロテオミクス-医学生物学を変える次世代技術の威力（細胞工学別冊）」が参考になると思います。

BN-PAGEに関して、また、この記事の内容全般に関して、ご意見やご質問がありましたら、どうぞお気軽にお問い合わせください。わかる範囲で、お答えさせていただきます。

謝辞

京都大学の遠藤剛先生、低温科学研究所の桑野晶喜さん、そして現在所属している研究室の田中亮一先生、田中歩先生には、研究面のみならず、この原稿の内容についても貴重なアドバイスを頂きました。この紙面を借りて厚く御礼申し上げます。

Received July 7, 2010, Accepted July 22, 2010, Published August 31, 2010

参考文献

1. Takabayashi, A., Kishine, M., Asada, K., Endo, T., and Sato, F. (2005) Differential use of two cyclic electron flows around photosystem I for driving CO₂-concentration mechanism in C₄ photosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 16898-16903.
2. Majeran, W., Zybailov, B., Ytterberg, A.J., Dunsmore, J., Sun, Q., and van Wijk, K.J. (2008) Consequences of C₄ differentiation for chloroplast membrane proteomes in maize mesophyll and bundle sheath cells. *Mol. Cell. Proteomics* 7, 1609-1638.
3. Ishihara, S., Takabayashi, A., Ido, K., Endo, T., Ifuku, K., and Sato, F. (2007) Distinct functions for the two PsbP-like proteins PPL1 and PPL2 in the chloroplast thylakoid lumen of Arabidopsis. *Plant Physiol.* 145, 668-679.
4. Ishikawa, N., Takabayashi, A., Ishida, S., Hano, Y., Endo, T., and Sato, F. (2008) NDF6: a thylakoid protein specific to terrestrial plants is essential for activity of chloroplastic NAD(P)H dehydrogenase in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol.* 49, 1066-1073.
5. Takabayashi, A., Ishikawa, N., Obayashi, T., Ishida, S., Obokata, J., Endo, T., and Sato, F. (2009) Three novel subunits of Arabidopsis chloroplastic NAD(P)H dehydrogenase identified by bioinformatic and reverse genetic approaches. *Plant J.* 57, 207-219.
6. Ishida, S., Takabayashi, A., Ishikawa, N., Hano, Y., Endo, T., and Sato, F. (2009) A novel nuclear-encoded protein, NDH-dependent cyclic electron flow 5, is essential for the accumulation of chloroplast NAD(P)H dehydrogenase complexes. *Plant Cell Physiol.* 50, 383-393.
7. 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.
8. Wittig, I., Braun, H.P., and Schägger, H. (2006) Blue native PAGE. *Nat. Protoc.* 1, 418-428.

The Strategies for Analyzing Protein Complexes Suitable for Genome Generation

Atsushi Takabayashi*

The Institute of Low Temperature Science, Hokkaido University