ミニレビュー

トレーサ法による微細藻類の
膜蛋白質の動態解析

相澤克則

植物は、環境が変化してもそれが一定の範囲内であれば、光合成の効率を維持できる。われわれは、微細藻類がその効率を保つ際に示す光化学系などの膜蛋白質の形成調節の解明を目指して、RI トレーサ法を利用している。手順を要約すると、生育中の細胞の RI 標識、蛋白質の抽出と分離、ラベルされた蛋白質の解析となる。これらに関しわれわれが研究中に経験し、調査した知見の一端を紹介したい。

他の生物の場合と同様に、 ^{14}C -, ^3H -アミノ酸を用いて、微細藻類の蛋白質を標識することが多い。蛋白質の合成速度を調べるには、RI-アミノ酸の取込みが律速にならず、蛋白質の分画に迅速に入る必要がある。また細胞内アミノ酸プールへの取込みは、短時間では蛋白質合成阻害剤の影響を受けにくいものが望ましい。緑藻の *Stichococcus bacillaris* UTEX 314 では、 ^{14}C -フェニルアラニンがこれらの条件を満たすことが示されている¹⁾。独立栄養的に生育する多くの微細藻類には、必須アミノ酸がない。また、細胞に取り込めるアミノ酸の種類は、おのおの藻種によって異なる上に、細胞内アミノ酸プールのサイズにも差がある。こういうことから、必須アミノ酸でラベルされる多くの動物細胞のように扱えない場合がある。たとえば、ラン藻の *Synechocystis* PCC 6714 は、ある種の紅藻、緑藻とは異なり、 ^{35}S -メチオニンを取り込める²⁾。ところが、RI 標識時の比放射能を 2 G から 40 TBq/mmol にし、硫黄化合物を添加しない培地 (S 欠) で数時間前処理しても、得られる蛋白質の放射活性は、さほど変わらない (相澤, 未発表)。プールのサイズと同様に、全蛋白質分画の各アミノ酸残基の % 頻度 (% frequency) もラベルの程度の目安となるが、この値も動物細胞とはいくぶん異なる。微細藻類が、どのアミノ酸を取り込むのか不明な

とき、S を含む蛋白質が対象であれば、 ^{35}S -硫酸などが利用できる。これは、S 源として硫酸塩で生育する微細藻類に使える一般法である。S 欠の前処理で細胞内の S のプールを減らし、キャリアフリーの ^{35}S -硫酸でラベルすると、蛋白質の比放射能を高くできる。しかし、 $^3\text{H}_2\text{O}$ や $\text{Na}_2^{14}\text{CO}_3$ による方法と同様、糖類や脂質などの他の分画にも ^{35}S が入るので、全蛋白質の合成速度は簡単には求められない。化合物や核種の違いによる利点もある。たとえば、 $\text{Na}_2^{14}\text{CO}_3$ を長時間の光合成で固定させ、その後に単離した光化学系などのサブユニット蛋白質の化学量論比を推定することができる³⁾。それは、翻訳後のアミノ酸側鎖の修飾が少ない場合、炭酸の ^{14}C は、蛋白質の 1 分子当たり、それぞれの分子量に比例した分だけ入っていると期待されるからである。 ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S , ^{125}I 以外の核種を用いた研究は、安定同位体の場合を含めてもきわめて少ない。 ^{59}Fe によるラベルの例では、膜蛋白質の抽出法と併用させ、ヘムや Fe-S クラスターを持つ蛋白質の推定に利用されている⁴⁾。既知の蛋白質にも、特異な元素を含むものが多いので、入手法や利用場所、計測法の問題を別にすれば、 ^{33}P 以外にも活用できる核種があるにちがいない。実際、生態学での安定同位体の活用には、目覚ましいものがある。さて、ラベルは、本来の生育条件において行うべきであるが、何らかの処理により、高比放射活性を狙うことも多い。ラン藻の *Synechococcus* PCC 7942⁵⁾ や緑藻の *Chlamydomonas reinhardtii* CC 125 の例⁶⁾ では、S 欠にすると、プールの減少によるラベル値の上昇と同時に、効率の良い硫酸の取込みも始まる。ところが、S 欠が長時間になると、*Synechococcus* PCC 6301 では、フィコシアニンの分解が始まり⁷⁾、緑藻の *Dunaliella bardawil* では、増殖中にクロロフィル含量の低下が起こる⁸⁾。したがって、ラベル時の培地組成や前処理法にも注意が必要である。

光化学系には、I と II (PSI, PSII と略) があり、それぞれのサブユニット蛋白質の含量は、生育環境に対応して調節されている^{9), 10)}。これらは、チラコイド膜に存在し、他の膜蛋白質と同様に抽出が難しい。もっとも、*Synechocystis* PCC 6803 などでは、 β -メルカプトエタ

ノールとドデシル硫酸リチウム (LDS) を含む緩衝液で、膜分画より 0℃ にて 9 割以上の膜蛋白質を可溶化できる¹⁰⁾。しかし、ナトリウム塩の SDS は低温で難溶解のため、0℃ での抽出には向かない。抽出した膜蛋白質は SDS や LDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE) により分離でき¹⁰⁾、オートラジオグラフィや免疫沈降法に続けられる。これに対し、Laemmli 法¹¹⁾ のような加熱抽出をすると、SDS-PAGE の分離ゲルの最上部に変性会合 (aggregation) した蛋白質が観察される。これは、高等植物や光合成細菌では、光化学系蛋白質などに由来したものであろう¹²⁾。数網にわたる微細藻類から膜蛋白質を加熱抽出しても、PSII の PsbA や PsbD, PSI の PsaA/B の変性会合が観察される (相澤ら, 未発表) ので、これらの膜蛋白質の加熱抽出も避けた方がよい。

活発に合成される PSII の PsbA は、抽出した膜蛋白質の SDS-PAGE とオートラジオグラフィのみで、その動態を解析できる稀な例である。一般に、この手順のみでは、PAGE で同一の移動をする別の蛋白質の混在は避けられない。そのために、真核生物の藻、たとえば *Chlamydomonas* では、チラコイド膜の蛋白質を SDS-PAGE で観察したい場合、細胞のラベル時に、細胞質の蛋白質合成をアニソマイシン¹³⁾ やシクロヘキシミド¹⁴⁾ などで阻害する簡便法がある。これにより、オートラジオグラフィでの蛋白質バンドは減少する。しかし、細胞質から葉緑体のチラコイドへ供給される蛋白質 (LHCII など) の合成も止めるので、本来のチラコイド膜の発達を観察できず、使用範囲が限定される。二次元電気泳動法によれば、原理的には各蛋白質の分離能を向上できるはずで、微細藻類の膜蛋白質にも利用される (たとえば、文献¹⁵⁾)。しかし、再現性の良い定量的な二次元法の実現には、膜蛋白質の電荷を変えずに高効率で抽出する方法や、等電点泳動中の両端部での変性防止、二次元目原点での変性会合の解消など、改善すべきところが多い。

これに対し、ラベルされた膜蛋白質を LDS など効率良く抽出した後に、抗体を添加し、種々の方法で抗原抗体複合体を回収する免疫沈降法は、特定の蛋白質の動態を調べるのに有効

である²⁾。この方法の難点は、一連の実験に数 ml の抗体が必要¹⁴⁾ で、自ら抗体を作る必要がある点と、会合しやすい膜蛋白質の特性から、可溶性蛋白質に比べ、その条件設定も容易ではない点である。しかし、その適応範囲の広さから、導入を勧めたい手法である。

ラベルに伴う問題を解消し、それぞれのトレーサや分析法の特徴をふまえて活用すれば、さまざまな環境下での蛋白質の動態などを、より詳細に把握できるに違いない。

Key Words : microalgae, photosynthesis,
protein synthesis, sulfur-35, thylakoid
protein

文 献

- 1) Ahmad, I. and Hellebust, J. A. : *J. Phycol.*, **29**, 294-300 (1993)
- 2) Aizawa, K. and Fujita, Y. : *Research in Photosynthesis*, IV, 329-332 (1992)
- 3) Lundell, D. J., Glazer, A. N. et al. : *J. Biol. Chem.*, **260**, 646-654 (1985)
- 4) Guikema, J. and Sherman, L. : *Biochim. Biophys. Acta*, **681**, 440-450 (1982)
- 5) Green, L. S. and Grossman, A. R. : *J. Bacteriol.*, **170**, 583-587 (1988)
- 6) Yildiz, F. H., Davies, J. P. et al. : *Plant Physiol.*, **104**, 981-987 (1994)
- 7) Schmidt, A., Erdle, I. et al. : *Z. Naturforsch.*, **37c**, 870-876 (1982)
- 8) Ben-Amotz, A. and Avron, M. : *Plant Physiol.*, **72**, 593-597 (1983)
- 9) Fujita, Y., Murakami, A., et al. : In ; "The Molecular Biology of Cyanobacteria", (Bryant, D. ed.), pp. 677-692, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht (1994)
- 10) Aizawa, K., Shimizu, T. et al. : *Photosynthesis Res.*, **32**, 131-138 (1992)
- 11) Laemmli, U. K. : *Nature*, **227**, 680-685 (1970)
- 12) 佐藤公行 : 植物細胞工学, **1**, 170-174 (1989)
- 13) Delepelaire, P. : *Photobiochem. Photobiophys.*, **6**, 279-291 (1983)
- 14) Herrin, D. and Michaels, A. : *Arch. Biochem. Biophys.*, **237**, 224-236 (1985)
- 15) Riethman, H. C. and Sherman, L. A. : *Plant Physiol.*, **88**, 497-505 (1988)

(岡崎国立共同研究機構基礎生物学研究所)