

令和元年6月14日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K05814

研究課題名(和文) 超分子複合体の形成過程追跡のための温度・圧力制御型電気泳動法および解析法の開発

研究課題名(英文) Development of Temperature- and Pressure-Regulated Electrophoresis Method and Analysis for the Study of Protein Supramolecular Complex Formation

研究代表者

石黒 亮 (ISHIGURO, Ryo)

岐阜大学・工学部・助教

研究者番号：20293540

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：独自に開発した装置を用い、高圧力によるタンパク質複合体の解離・会合平衡の摂動を高圧力Nativeポリアクリルアミドゲル電気泳動法(HP Native PAGE)によって定量的に調べるための方法論の開発をおこなった。標準試料としてブタ心臓由来乳酸脱水素酵素4量体を用い、実験条件や手順の最適化をおこなった。その結果に基づき、様々な圧力、ゲル濃度、印加電圧を用いた系統的なHP Native PAGE分析によって、高圧力下での解離によって生成する複数の解離成分および中間体成分を分離・同定・定量化する方法論を提案する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多くのタンパク質は会合によって活性を制御している。したがって、様々なタンパク質およびそれらの変異体の会合特性を調べることは、タンパク質の活性制御機構の解明や、より有用な新規タンパク質の設計において重要である。

タンパク質の会合特性を調べる方法の一つとして、会合平衡の圧力依存性の研究がしばしば行われてきた。しかし、タンパク質複合体が複数のプロトマーから構成される場合、解離過程に複数の中間体成分が現れる可能性があり、これまで行われてきた分光学的手法による解析は困難である。本研究で開発した実験方法は複雑な解離過程にも有効であり、タンパク質の会合特性の解明に大きく貢献すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we developed the methodology of high pressure native polyacrylamide gel electrophoresis (HP Native PAGE) to quantitatively investigate the dissociation equilibrium of protein supramolecular complex perturbed by high hydrostatic pressure, using a homemade apparatus. We used tetrameric lactate dehydrogenase from pig heart as a standard sample, and optimized the experimental conditions and procedures. Based on these results, we propose the methodology, in which systematic HP native PAGE using various pressures, gel concentrations, and applied voltages enables to separate, identify, and quantify the several dissociation species or intermediates emerged during the dissociation process induced by high pressure.

研究分野：生体分子の自己組織化や解離・会合過程に関する物理化学

キーワード：分析化学 電気泳動分析 高圧力 タンパク質超分子複合体

## 1. 研究開始当初の背景

多くのタンパク質は超分子複合体を形成することで、その機能を制御している。これらの構造情報はX線結晶解析や電子顕微鏡、質量分析などによって集積されつつある。しかし、活性の制御機構の理解や、有用な新規タンパク質の設計のためには、超分子複合体の形成・解離過程や安定性などを明らかにする必要がある。

タンパク質超分子複合体の形成過程を明らかにするためには、環境によって会合平衡を摂動しつつ、全ての構成分子および解離中間体を同定・定量しなければならない。特に200 MPaまでの高圧力はタンパク質の三次構造にあまり影響を与えず、その会合状態に摂動を与えることが知られている。一般に、高圧力下でのタンパク質の会合状態の測定にはX線小角散乱法などの分光学的手法が使用されている。しかし、複数のプロトマーから構成される超分子集合体を対象とする場合、解離過程において幅広い分子量分布の多成分系を取り扱うことになる。その結果、各成分の寄与を分離することが必要になり、解析が非常に複雑になる。

ポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE)法は多成分混合系に対して高い分離能を持ち、安価で簡便な手法である。特にNative PAGE法はタンパク質に変性剤を添加しないで行うため、天然の会合状態や立体構造を保ったタンパク質の分析が可能であり、また濃度勾配ゲルを用いることによって、泳動位置から分子量を決定できる。更に、温度や圧力を制御した状態でNative PAGEを行う手法が古くから開発されており、種々の温度、圧力下での会合状態の変化の可視化が可能である。

そこで我々は高圧力電気泳動装置を自作し、シャペロンタンパク質やアミロイド線維が高圧力下で解離する様子を、均一ゲルを用いた高圧力Native PAGE上で観測した[1,2]。また、その解析過程において、染色ゲルの精密な画像解析により、泳動パターンに含まれる各成分の濃度や成分間の反応速度の情報を抽出できることを見出した。これらのことから、濃度勾配ゲルNative PAGE法を高圧力で行うことにより、タンパク質超分子複合体の様々な温度・圧力下での解離状態における各成分の同定・定量と、それらに基づく熱力学的および速度論的解析が可能になるのではないかとこの発想に至った。

[1] Fujisawa, T. et al., *High Pressure Res.*, 33 (2013) 258-264.

[2] Ishiguro, R. et al., *Electrophoresis*, 36 (2015) 893-901.

## 2. 研究の目的

(1) 我々が独自で開発した、ディスクゲル式の温度・圧力制御型高圧力電気泳動装置を改良して、ポリアクリルアミド濃度勾配スラブゲルを使用可能な電気泳動装置を開発する。この装置を用いて高圧力Native PAGE分析をおこない、温度・圧力によるタンパク質複合体の解離中間体の分布の変化を観測するための実験条件や解析方法の最適化をおこなう。試料として、らせん会合体を形成する *Rhodococcus rhodochromus* J1 由来ニトリラーゼを用いる。

(2) 複合体・解離中間体・単量体が泳動中に再解離・再会合することを考慮した泳動パターンの計算機シミュレーションをおこない、実験結果と比較することで、複合体形成の平衡定数、反応速度、および熱力学的安定性を見積もる方法論を確立する。

## 3. 研究の方法

(1) ポリアクリルアミド濃度勾配ディスクゲル作製器具の開発

図1に我々が所有する高圧力電気泳動装置の模式図を示す。当初の目的では、高圧容器内に格納できる円筒状のスラブゲル電気泳動槽を設計・作製し、それを用いて高圧力下における濃度勾配ゲルNative PAGE分析をおこなう予定であった。しかし、電気泳動中のジュール熱の発生による温度上昇の効果を抑えるためには、泳動断面の小さなディスクゲル電気泳動槽の方がより運用に適していると考えた。そこで、濃度勾配ディスクゲルをガラス細管内で作製するための作製槽と、専用の微量グラジエントミキサーの設計・開発をおこなった。実機の製造は日本エイドー株式会社に依頼した。

(2) 高圧力Native PAGE分析の実験条件および解析法の最適化

*Rhodococcus rhodochromus* J1 由来ニトリラーゼおよびブタ心臓由来乳酸脱水素酵素(LDH)などの

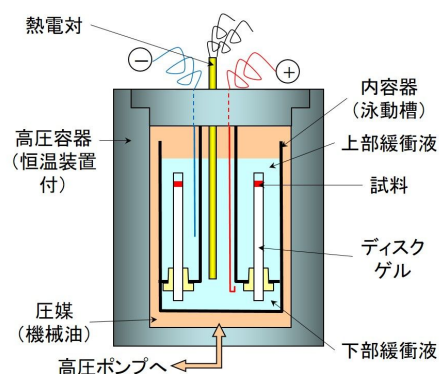


図1 高圧電気泳動装置の模式図。圧媒(機械油)を満たした円筒型高圧容器内に泳動槽を浸漬し、加圧状態で電気泳動を行うことができる。耐圧200 MPa、4~40の温度制御が可能である。泳動槽は最大6本のディスクゲルを設置できる。

タンパク質会合体の高圧力 Native PAGE 分析を通して、この方法における実験条件や解析手順を検討した。得られた PAGE ゲルは定法に従って CBB 染色をおこない、可視イメージスキャナー（アイメジャー株式会社製 GELSCAN-2）を用いて画像化し、48 bit カラースケールまたは 16 bit グレースケール、解像度 300 ppi の透過画像データを作成した。ゲルの各位置におけるグレースケールを吸光度に変換し、泳動距離ごとに総和することにより、黒化度・泳動距離プロフィールデータを得た。

高圧力 Native PAGE 分析によってタンパク質会合体の圧力解離を観測するためには、実行可能な温度・圧力範囲内で会合平衡が大きく変化するような溶媒条件を選ぶことが必要である。一方、温度や溶媒は Native PAGE における泳動速度や分離能にも大きく影響する。そこで、様々な温度・圧力・溶媒条件で Native PAGE 分析をおこない、上記の条件に相応しい実験条件の探索をおこなった。

泳動時の印加電圧（または電流値）もまた、Native PAGE 分析の重要な因子である。平衡状態にあるタンパク質複合体と解離中間体を電気泳動によって分離する場合、泳動中にも再解離・再会合反応が起こると予想される。したがって、平衡状態における複合体や解離中間体の分布を明らかにするためには、高い電圧値を用いて泳動速度を可能な限り早く、泳動時間を短くする必要がある。その一方、高電力はジュール熱による温度上昇を引き起こすため、泳動速度には限界がある。そこで、様々な印加電圧を用いて高圧力 Native PAGE 分析をおこない、泳動速度が解析結果に与える影響を調べた。

#### 4. 研究成果

##### (1) 濃度勾配ディスクゲルを用いた Native PAGE 法の検討

濃度勾配スラブゲルはグラジエントミキサーを用いて濃度勾配を作りながらアクリルアミド溶液を平板型に流し込み、重合させることによって作製する。一方、ガラス細管内で作製されるディスクゲルは容量が小さいため、安定した濃度勾配を作ることが困難である。そこで、複数のガラス管を垂直に、同じ高さに並べて固定できるゲル作製槽と、微量でも濃度勾配を作ることができる微量グラジエントミキサーを設計・作製した。図2に我々が用いた濃度勾配ディスクゲル作製槽と微量グラジエントミキサーを示す。ゲル作製槽は内径 2.6 mm、全長 95 mm のガラス管 14 本をシリコンパッキング内に挟み込む形で内蔵し、ガラス管上端 10 mm までゲル溶液を満たすと、総容量は 9 mL になる。また、微量グラジエントミキサーは総容量 31 mL であり、残液が 1 mL まで減少しても濃度勾配を作ることができるように設計した。

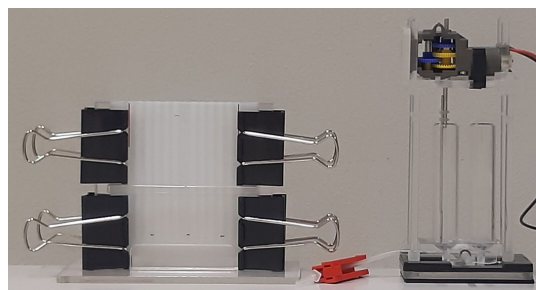


図2 左：濃度勾配ディスクゲル作製槽。右：微量グラジエントミキサー。

図3に、作製したポリアクリルアミド濃度 7~17% の濃度勾配ディスクゲルを用いて、様々な標準タンパク質の Native PAGE をおこなった結果を示す。14~480 kDa の広い質量範囲のタンパク質混合物を一本の濃度勾配ディスクゲルで分離することができた。

一方、Native PAGE におけるタンパク質の泳動速度は大きさだけでなく電荷量にも依存する。濃度勾配ゲルを用いた Native PAGE において電荷の影響を取り除き、泳動距離から分子量を見積もるためには、泳動速度が十分に遅くなるまで時間をかけて泳動をおこなう必要がある。得られた実験結果をもとにシミュレーションをおこなったところ、少なくとも 10 時間以上の泳動時間が望ましいことが分かった。しかし、平衡状態にあるタンパク質複合体と解離中間体を分離するためには、泳動時間を可能な限り短くする必要がある。したがって、今回作製した濃度勾配ディスクゲルは広い会合数分布の解離中間体混合物を分離することには有用であるが、泳動距離から中間体の会合数を同定することは困難であると考えられる。そこで以降は、様々なゲル濃度の均一ディスクゲルを用い、泳動速度のゲル濃度依存性の解析（Ferguson plot 法）による会合数同定をおこなうことにした。

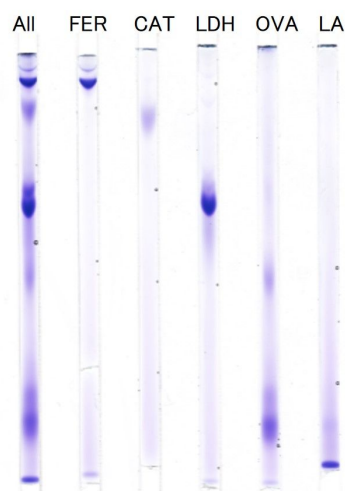


図3 7~17%濃度勾配ディスクゲルを用いた様々な標準タンパク質の Native PAGE。右から LA, ラクトアルブミン(14 kDa); OVA, オボアルブミン(43 kDa); LDH, 乳酸脱水素酵素(150 kDa); CAT, カタラーゼ(240 kDa); FER, フェリチン(480 kDa); AII, これらすべて。

### (2) 微生物由来ニトリラーゼの高圧力 Native PAGE 分析

多くのニトリラーゼはらせん会合体を形成することが知られている。我々はこれまでに高輝度 X 線を用いた小角散乱法によって、*Rhodococcus rhodochrous* J1 由来ニトリラーゼが塩濃度と温度の上昇に伴い 10~12 量体の会合体を形成すること、および 100 MPa までの圧力上昇に伴いプロトマーである 2 量体へと解離することを確認した。一方、Native PAGE 分析においては、温度が高いほどバンドが広がって分離が悪くなり、塩濃度が高いほど泳動速度の減少やジュール熱による温度上昇が問題になる。そこで、ニトリラーゼのらせん会合体の圧力解離を高圧力 Native PAGE によって観測するための溶媒条件を大気圧における X 線小角散乱によって検討したところ、50 mM リン酸カリウム緩衝液 pH7.5 中では、室温付近でも平均会合数が 5 付近となった。この緩衝液を Native PAGE における溶媒として用いたところ、ディスクゲル 1 本に対して印加電圧 180 V の条件で、温度を制御しつつ 1 時間で泳動を完了することができた。

図 4 に様々な濃度のゲルを用いたニトリラーゼの大気圧における Native PAGE の結果を示す。#1~#4 のバンドが観測され、ゲル濃度の増加によってそれぞれ泳動距離が減少した。図 5 に、これらのバンドに対する Ferguson plot を示す。Ferguson plot とは、ゲル濃度に対して泳動距離や泳動速度の対数をプロットしたものであり、その傾きは分子量との相関を示す。この解析および X 線小角散乱の解析をもとに、#1, #2, #3, #4 をそれぞれ 2 量体, 2 量体' (2 量体の異性体), 6 量体, 12 量体に帰属した。

上記の溶媒および泳動条件を用い、室温付近でニトリラーゼの高圧力 Native PAGE をおこなった。解離・会合平衡状態を確保するために、試料をゲル内に導入した状態で泳動槽を高圧容器内に組み込み、目的の温度・圧力を 2 時間保持したのち、泳動をおこなった。図 6 に 6 %濃度のゲルを用い、26℃ 様々な圧力下で Native PAGE をおこなった結果を示す。30 MPa までの加圧によって 6 量体、12 量体のバンドがやや薄く、2 量体のバンドがやや濃くなったことから、圧力上昇によって解離が進行したと考えられる。50 MPa を超えると、6 量体、12 量体のバンド付近の広い領域が染色され、更なる圧力上昇によって染色がより泳動距離の短い領域に広がったことから、ランダムな凝集が進行していると考えられる。このように、大気圧において会合体の割合がもともと大きくないこと、また高圧力によって解離と同時にランダムな凝集が進行することから、高圧力 Native PAGE の実験条件において、ニトリラーゼの圧力解離を観測することは困難であると判断した。

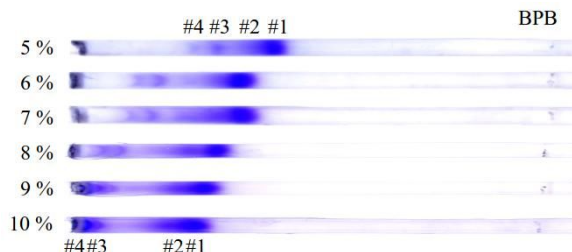


図 4 大気圧におけるニトリラーゼの Native PAGE。泳動方向は左から右、左の数値はゲル濃度を示す。右端に BPB マーカーの泳動位置を示す。

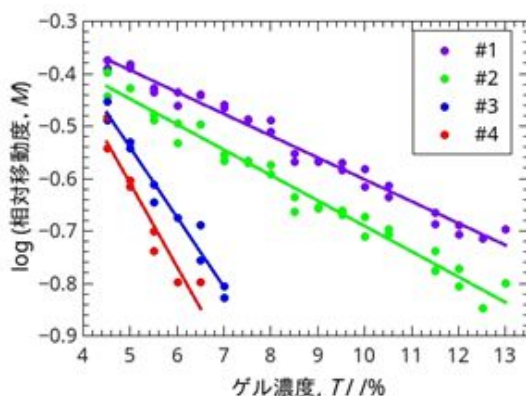


図 5 図 4 の各バンドに対する Ferguson plot。横軸はゲル濃度、縦軸は BPB マーカーに対する各バンドの相対移動度の対数を示す。プロットの傾きから、各バンドの会合数を見積もった。

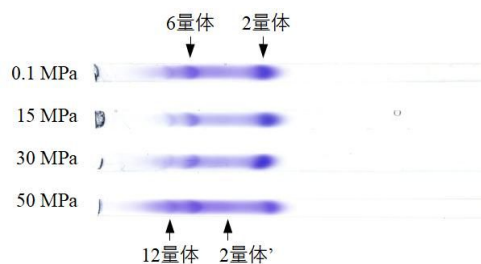


図 6 ニトリラーゼの高圧力 Native PAGE。6 %ゲルを使用し、26℃ において実験をおこなった。左の数値は圧力値を示す。

### (3) ブタ心臓由来乳酸脱水素酵素(LDH)の高圧力 Native PAGE 分析

上記のように、ニトリラーゼは高圧力電気泳動の標準試料としては適当でないことがわかった。そこで、分光学的手法によって圧力解離が既に観測されている、ブタ心臓由来乳酸脱水素酵素(L-lactate dehydrogenase, LDH)を標準試料として用いることを検討した。LDH は 4 量体タンパク質であり、高圧力下における蛍光偏光解消によれば、120~160 MPa を転移圧力として単量体へ、X 線小角散乱によれば、120 MPa を転移圧力として 2 量体へ解離すると報告されている[3,4]。また、どちらの研究においても、50 mM Tris-HCl 緩衝液が用いられており、比較的低い塩濃度の溶媒中での圧力解離が期待できる。そこで、Native PAGE において使用する溶媒の検討をおこない、予備実験の結果、15 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, pH7.5 を溶媒として使用することにした。

図7に大気圧 25 における LDH の Native PAGE をおよび黒化度プロファイルを示す。110 V, 60 min の泳動によって、泳動距離は短いがピークは鋭く、十分な分離能を持つ泳動パターンが得られた。また塩濃度が低く、ジュール熱の発生量が少ないため、ディスクゲル 6 本を同時に用いることができた。黒化度プロファイルによれば、主バンド#1 の周囲に微量の副バンド#2 があり、またゲル濃度によってそれらの順序が逆転した。そこで、Ferguson plot をおこない、#1 および#2 の分子量決定をおこなった。その結果、#1 は 4 量体に帰属されたが、#2 は 2 量体と単量体の中間付近の分子量となり、どちらであるかを定めることはできなかった。

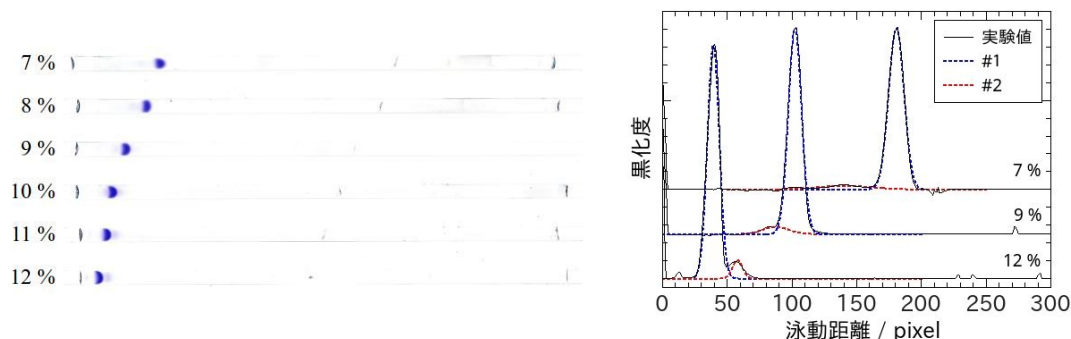


図7 左図：大気圧，25 における LDH の Native PAGE。泳動方向は左から右，左の数値はゲル濃度を示す。右図：7, 9, 12 %ゲルから得られた黒化度プロファイル。ガウス曲線をフィットさせることによって、それぞれ#1 (青点線) および#2 (赤点線) に分離できる。

上記の泳動条件に従い、25 において高圧力 Native PAGE をおこなった。ディスクゲルには 5.5~12 %の様々な濃度のゲルを使用した。また、ニトリラーゼの場合と同様に、試料導入後、泳動直前に 2 時間の温度・圧力平衡時間を設定した。図 8 に、7%ゲルの場合を例として、様々な圧力下での Native PAGE 結果を示す。加圧によって#1 が減少し、#2 が増加したことから、圧力上昇に伴って解離が進行していると考えられる。

また、100 MPa を超えると泳動距離の短い領域に新たなバンド (#3) が現れた。泳動距離の短さや、このバンドの生成が不可逆であったことから、ランダムな凝集によるものと考えられる。

CBB による LDH の染色が会合状態に依らないと仮定して、黒化度プロファイルのピーク面積より各成分の重量分率を算出し、圧力解離曲線を作成した。その結果を図 9 に示す。様々なゲル濃度に対して解析をおこなった結果、ゲル濃度 5.5~7.5 %の場合には#1 と#2 のピーク中心が十分に離れており、ゲル濃度に影響しない解析結果が得られることがわかった。図 9 によれば、本研究によって得られた圧力解離の転移圧力は 40~50 MPa である。これは、過去に報告された、蛍光偏向解消や X 線小角散乱より得られた 120~160 MPa と比較してかなり低い[3,4]。この違いが溶媒の塩濃度に依存するものなのか、アクリルアミドゲル中という Native PAGE の特殊な環境によるものなのか、今後の検討課題である。

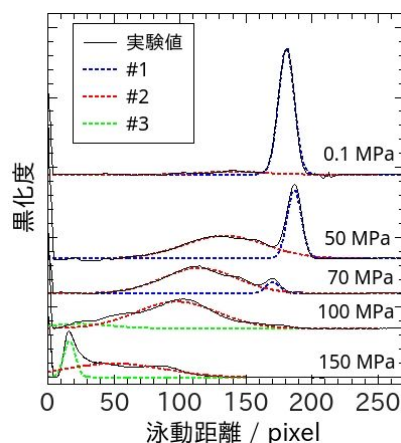


図8 25 様々な圧力における LDH の Native PAGE (7%ゲルの場合)。それぞれ#1 (青点線)、#2 (赤点線)、#3 (緑点線) に分離できる。

最後に、印加電圧を 110~310 V に変化させた場合に、泳動結果がどのように影響されるかを調べた。泳動時間は、各成分の泳動速度が印加電圧に比例すると仮定して、泳動距離が等しくなるように設定した。また、ジュール熱の発生を抑えるため、ディスクゲルの本数は 1 本とした。図 10 に、50 MPa, 25 における 7 %ゲルを用いた Native PAGE の黒化度プロファイルを印加電圧毎に比較した結果を示す。印加電圧によって#2 の形状が変化し #2 が少なくとも 2 種類の成分(ここでは#2-1 #2-2 とする)からなる複合ピークであることがわかった。印加電圧によってピーク形状が変化した理由として、泳動時間の短縮によって泳動中の再解離・再会合過程が抑制され、成分比が変化したためと考えられる。すなわち、泳動時間の変化による組成の変化が泳動中の再解離・再会合反応によるものとするれば、これを解析することにより、

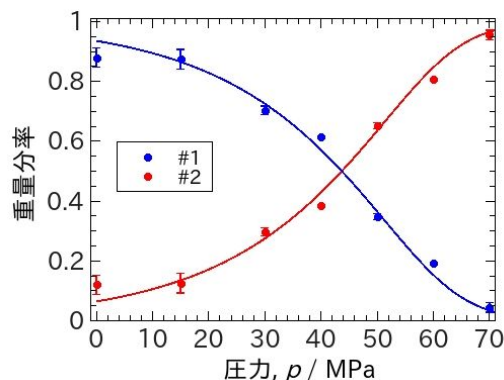


図9 黒化度プロファイルの解析より得られた、LDH の圧力解離曲線。各プロットは 5.5~7.5 %ゲルを用いた場合の平均値である。

温度・圧力平衡化時の（泳動前の）複合体および各解離成分の分布を見積もり、同時に解離や会合の速度論を解析できるかもしれない。

[3] King, L. & Weber, G., *Biochemistry*, 25 (1986) 3632-3637.

[4] Fujisawa, T. et al., *Biochemistry*, 38 (1999) 6411-6418.

#### (4) 今後の予定

高圧力 Native PAGE において、印加電圧の依存性を調べることにより、異なる成分の分離と、速度論的過程の解析の可能性が発見された。今後は、これらと Ferguson plot 解析を組み合わせることで分離した成分の同定を目指し、同時に速度論的過程の解析方法を検討する。今回、ニトリラーゼを用いた研究が計画通りに進展しなかったことにより、本来予定していたコンピュータシミュレーションによる速度論的過程の解析をおこなうことができなかったが、今回明らかになった泳動時間の効果はそれに大変役立つと期待している。

#### 5. 主な発表論文等

##### 〔雑誌論文〕(計2件)

1) Miwa, T., Ishiguro, R., Kameyama, K., Fujisawa, T., "Quantitative analysis of dissociation of LDH by high pressure native PAGE", *High Pressure Research* (査読あり) 39 (2019) 218-224.

<https://doi.org/10.1080/08957959.2018.1564822>

2) 石黒 亮, 藤澤 哲郎, "高圧力電気泳動法を用いたタンパク質解離会合系の定量的解析", *高圧力の科学と技術* (査読あり) 27 (2017) 26-32.

<https://doi.org/10.4131/jshpreview.27.26>

##### 〔学会発表〕(計3件)

1) Miwa, T., Ishiguro, R., Kameyama, K., Fujisawa, T., "Quantitative analysis of dissociation of LDH by high pressure native PAGE", 10<sup>th</sup> International Conference on High Pressure Bioscience and Biotechnology (2018).

2) 三輪 智也, 石黒 亮, 亀山 啓一, 藤澤 哲郎, "高圧 Native PAGE 法による高イオン強度緩衝液系での微生物由来ニトリラーゼの会合状態の研究", 第 58 回高圧討論会 (2017).

3) 林口 隆司, 石黒 亮, 亀山 啓一, 藤澤 哲郎, "高圧分光法を用いた微生物由来ニトリラーゼの会合過程の研究", 第 58 回高圧討論会 (2017).

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：藤澤 哲郎

ローマ字氏名：FUJISAWA, Tetsuro

所属研究機関名：岐阜大学

部局名：工学部

職名：教授

研究者番号(8桁): 10231565

##### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：篠田 宗佑

ローマ字氏名：SHINODA, Sohstake

研究協力者氏名：三輪 智也

ローマ字氏名：MIWA, Tomoya

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

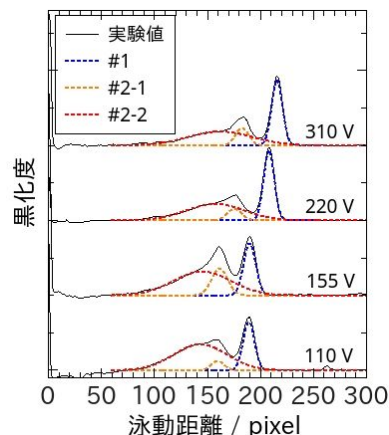


図 10 LDH の Native PAGE 黒化度プロファイルの印加電圧依存性。50 MPa, 25 において、7 %ゲルを用いた場合。