

先端生物工学演習Ⅱ

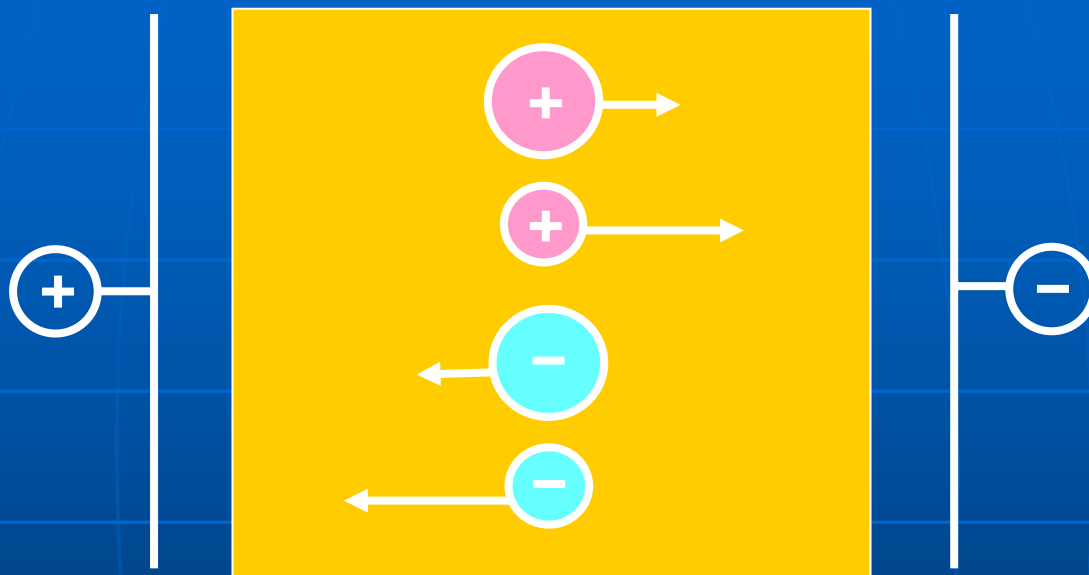
「タンパク質の電気泳動」

2008年10月14日

話の中身

- 電気泳動という手法(一般)
- アミノ酸の電荷とタンパク質の電荷
- 具体的な実験手法について(原理)
 - Native(構造や機能が破壊されていないタンパク質)
 - SDS(変性条件下でのタンパク質)
- 応用例
 - 等電点電気泳動法と二次元電気泳動
 - 非特異的染色法と特異的染色法(検出定量の方法)

電気泳動



粒子の移動速度 (cm s^{-1})

電場 (V cm^{-1})

$$v = u \times E$$

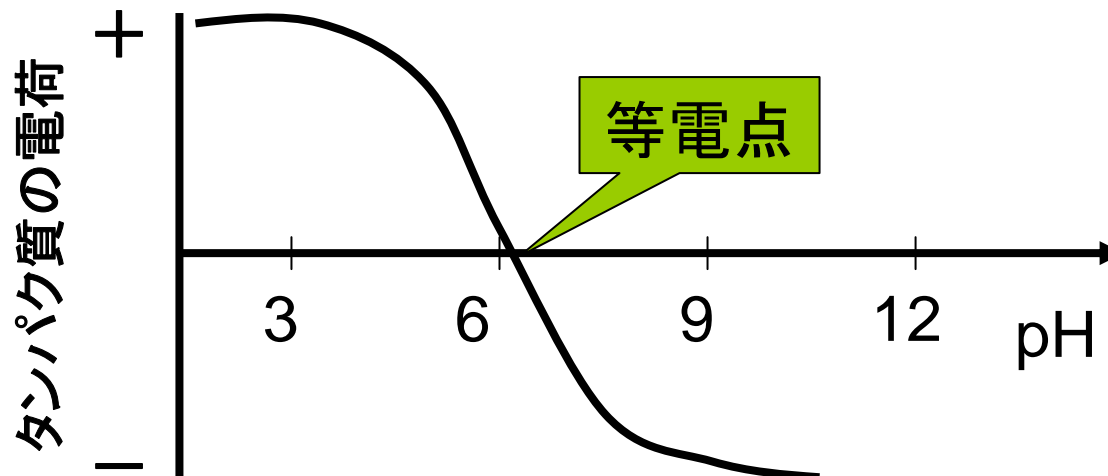
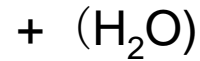
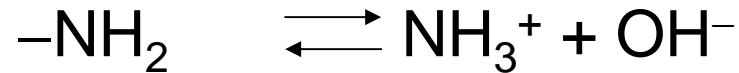
電気泳動移動度 ($\text{cm}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$)

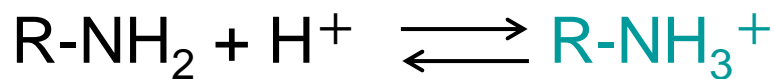
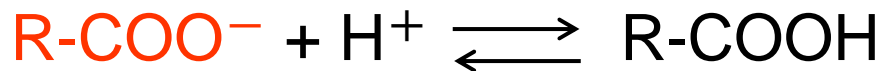
(電荷、分子量に依存)

電気泳動法の概説

- 原子・分子よりも大きな粒子として分散している物質
 - コロイドとしての性質を有する。
 - コロイド粒子を含む溶液に電場として直流電圧を加えると、いずれかの電極に向かって移動する。～電気泳動(electrophoresis)～
 - 溶液中のイオンがコロイド表面に吸着する
 - コロイド粒子中に含まれる有機の解離基がイオン化する
 - 電荷 Q を有するコロイド粒子溶液に電場 E を加えると……
 - 移動する粒子に対し、媒質との摩擦抵抗 F
 - $F = v \times f$ 、 v : 粒子の移動速度、 f : 摩擦係数
 - 定常状態では、 $F = Q \times E$ なので
 - $v \times f = Q \times E$
 - 電気泳動移動度 $u = v/E = Q/f$
 - 粒子の移動度がその粒子の電荷量と摩擦係数に関係する。
 - 摩擦係数は主に粒子の大きさや形状に依存する。

アミノ酸(残基)の電荷

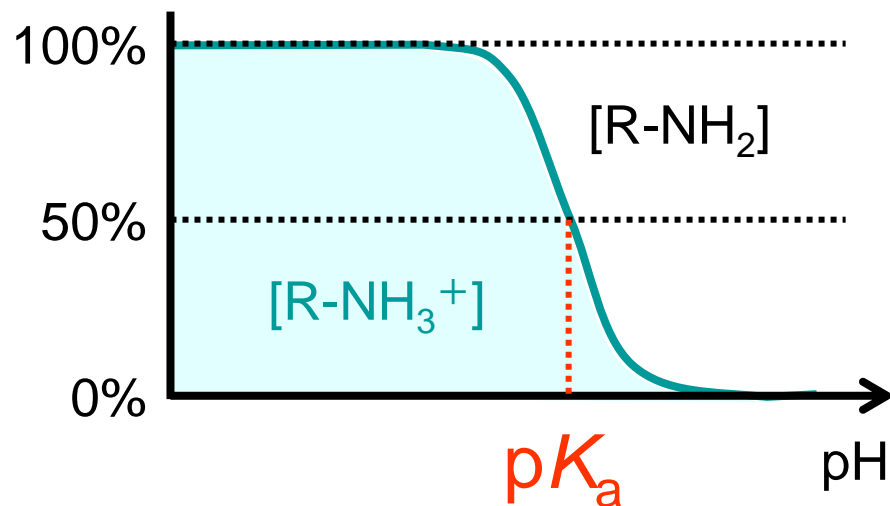
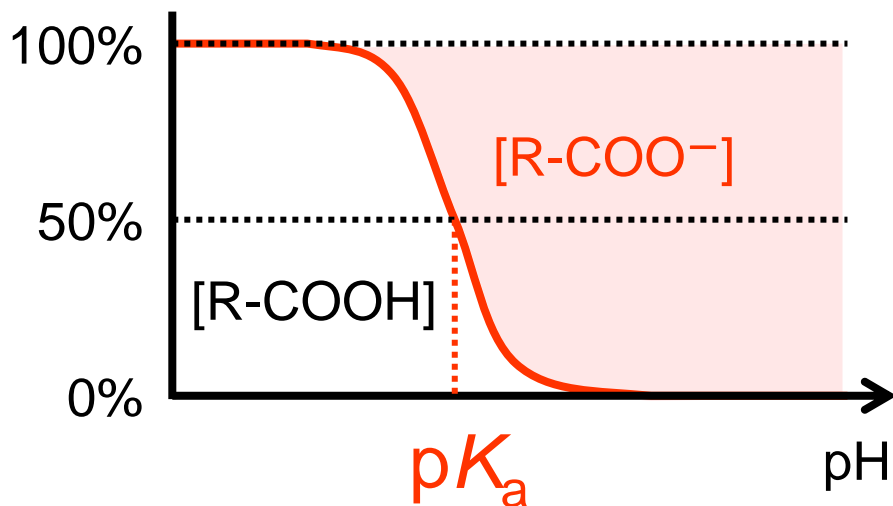




$$K_a = \frac{[\text{R-COO}^-][\text{H}^+]}{[\text{R-COOH}]}$$

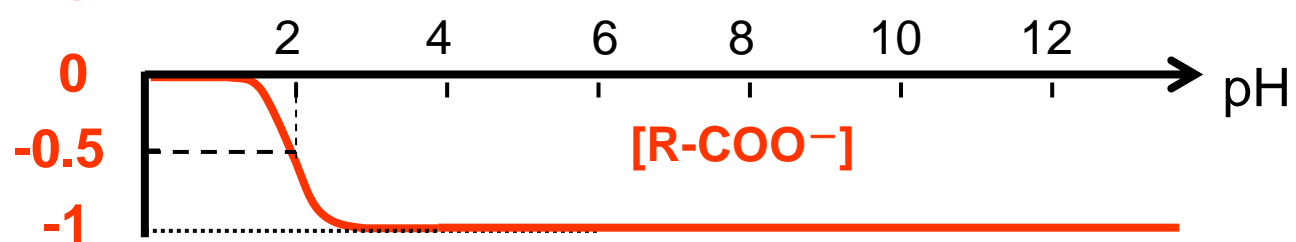
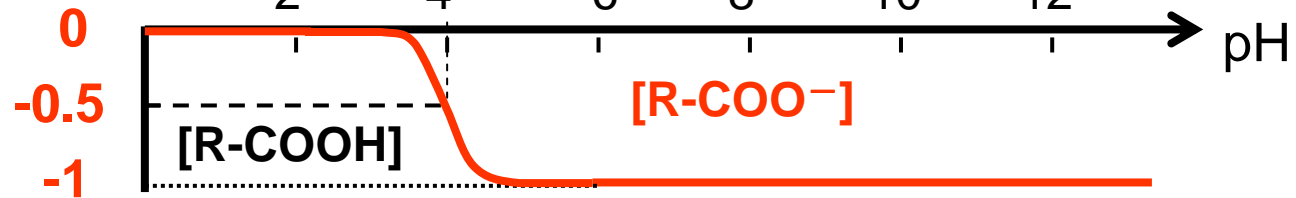
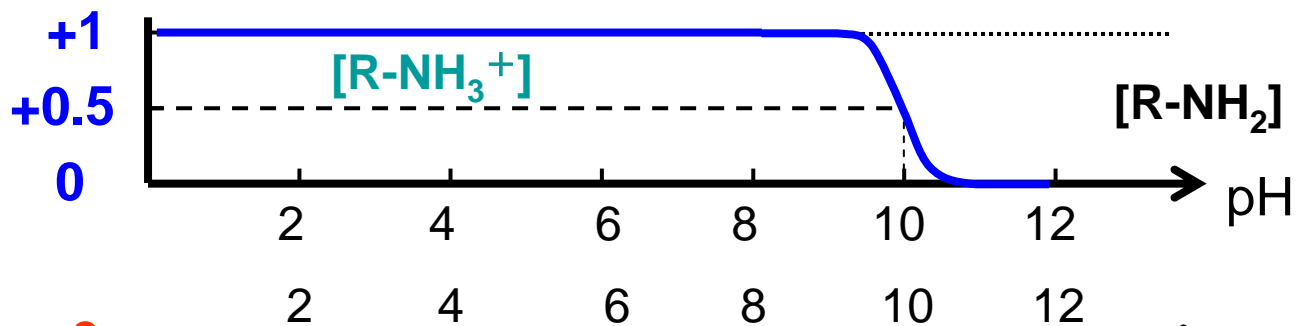
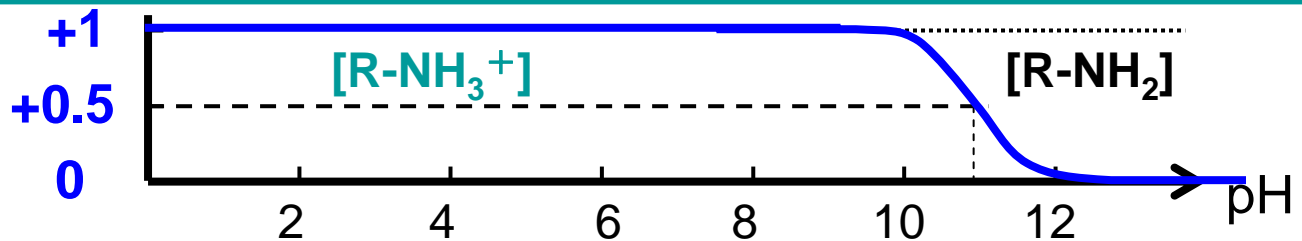
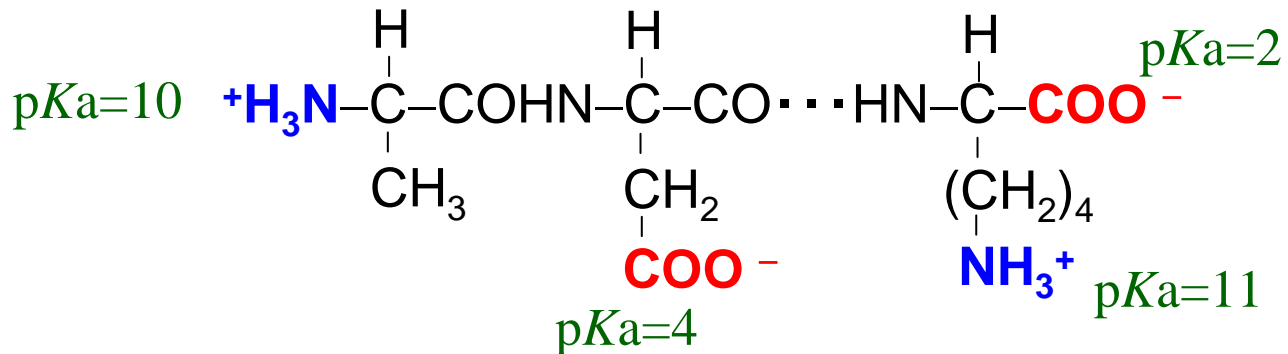
$$K_a = \frac{[\text{R-NH}_2][\text{H}^+]}{[\text{R-NH}_3^+]}$$

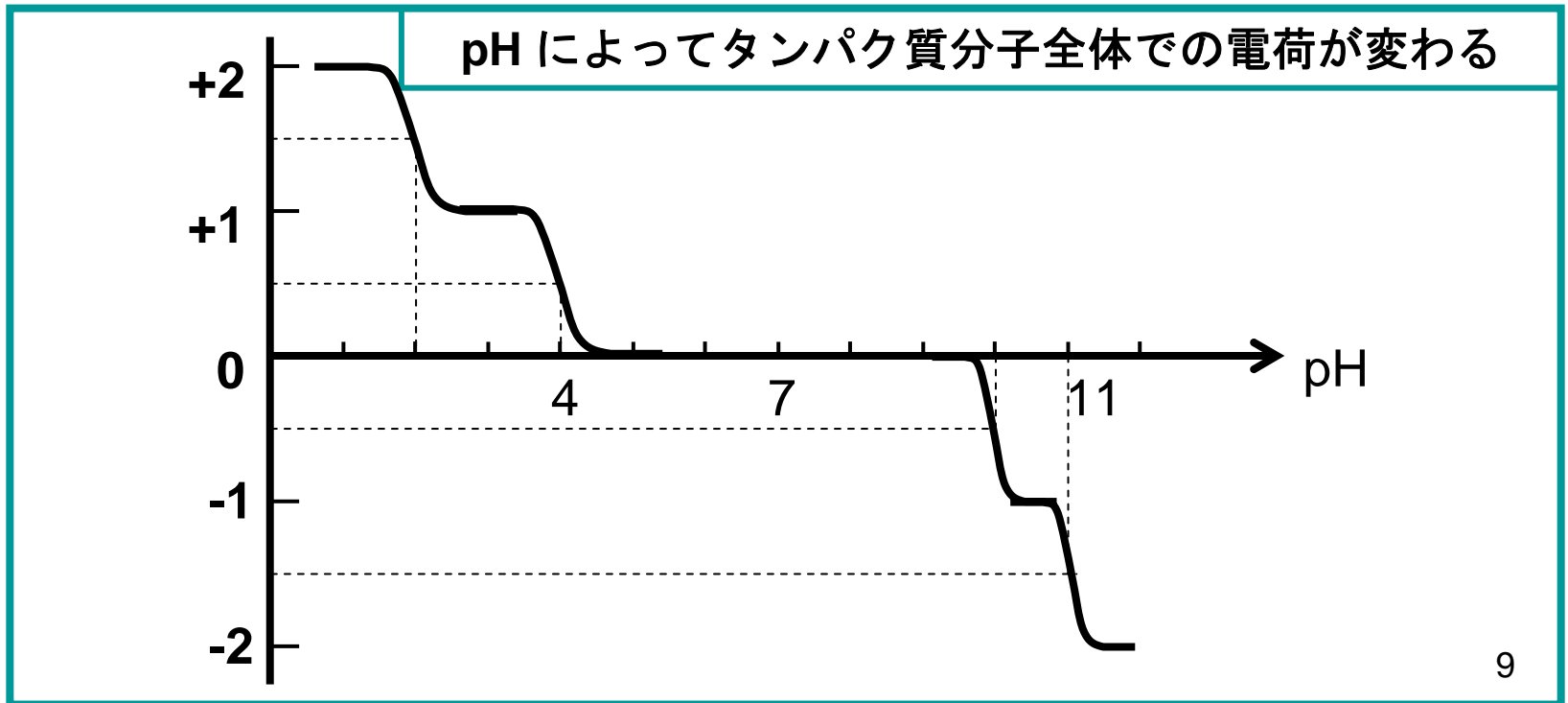
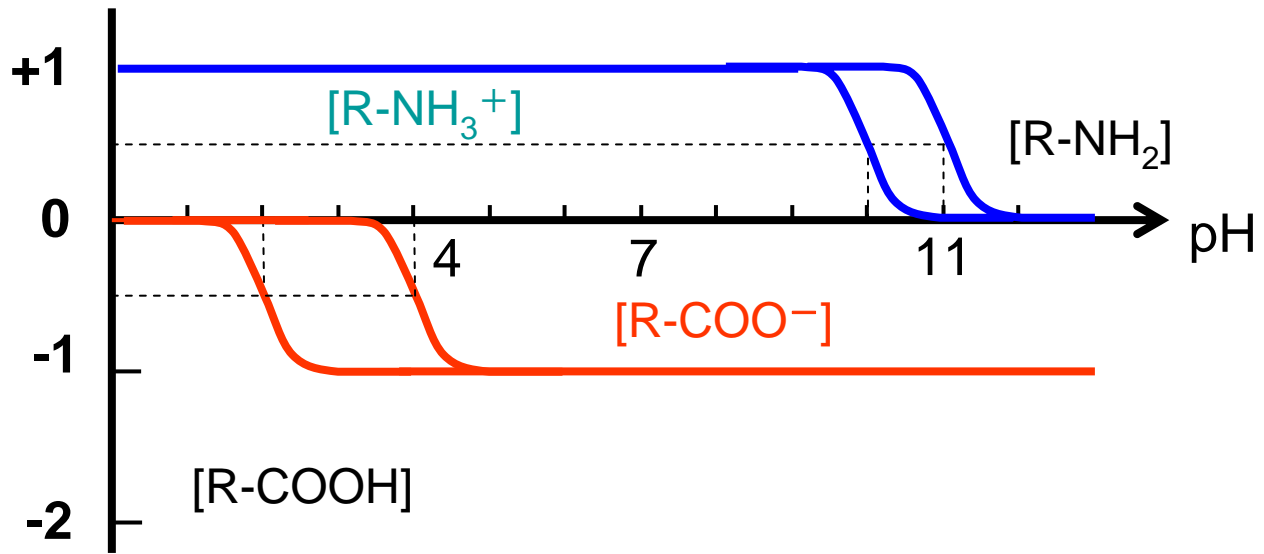
$$pK_a \cdots \left\{ \begin{array}{l} [\text{R-COO}^-] = [\text{R-COOH}] \\ [\text{R-NH}_2] = [\text{R-NH}_3^+] \end{array} \right\} \text{となるpH}$$



タンパク質分子内のアミノ酸解離基の pK_a

α -COOH基	1.7~2.3
α -NH ₂ 基	9.0~10.8
酸性アミノ酸	
Asp側鎖COOH基	3.9
Glu側鎖COOH基	4.3
塩基性基を持つアミノ酸	
His側鎖イミダゾール基	6.0
Lys側鎖NH ₂ 基	10.5
Arg側鎖グアニジル基	12.5
含硫アミノ酸	
Cys側鎖チオール基(SH)	8.3

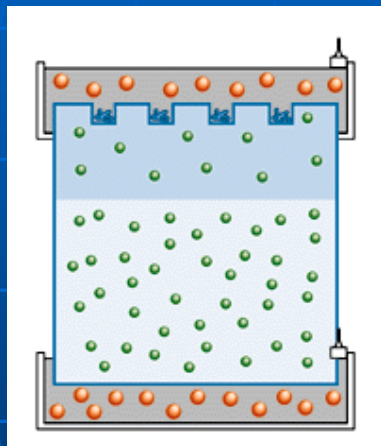




電気泳動実験の実際

Laemmli法 (不連続緩衝液法という) の溶液系

separating gel stacking gel



Stacking gel:

Tris-HCl (pH6.8),

6 - 18 % Polyacrylamide

Separating gel:

Tris-HCl (pH8.3),

6 - 18 % Polyacrylamide

Running buffer:

Tris (pH8.3),

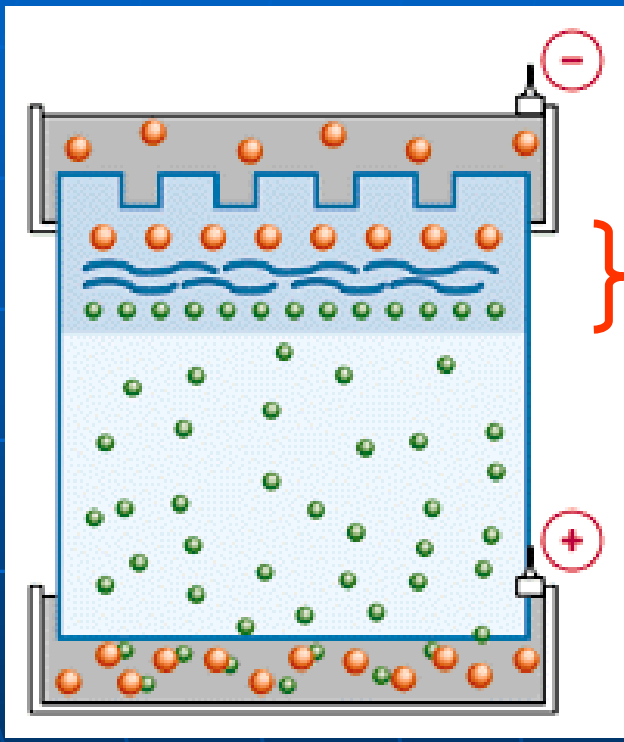
Glycin (HClがない)

サンプルには色素とGlycerolを加える。

濃縮ゲルの中で

stacking gel

separating gel



pH6.8 ではGlyの解離度が低く

$$u_{Cl} > u_{protein} > u_{Gly}$$



先行するClと遅く移動するGlyの間のイオン濃度が低下し、抵抗値が上昇、つまり高電圧がかかる。その結果、GlyはClに大きく離されずにすぐ後ろをついてくる。



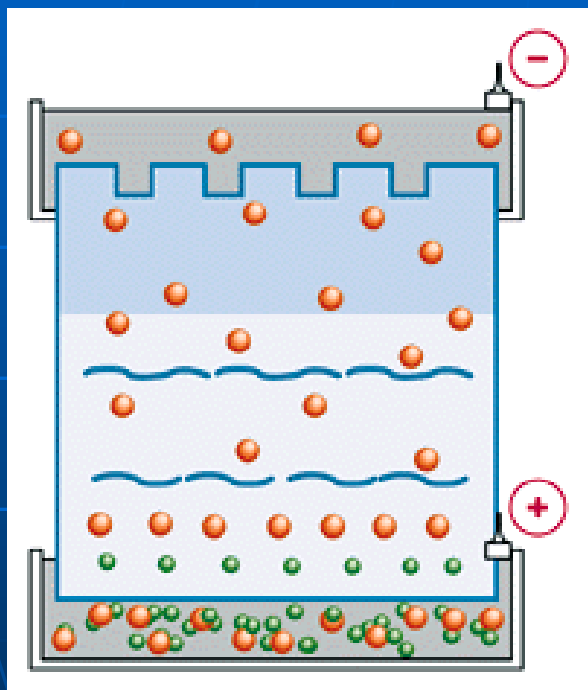
タンパク質サンプルはClとGlyの高電圧領域にはさまれて移動する

Cl⁻ : leading ion

Gly⁻ : trailing ion

分離用ゲルでは

separating gel stacking gel



- 分離用ゲルに入るとグリシンの解離度が変わり電気泳動移動度 u_{Gly} が大きくなる。
- グリシンがタンパク質に先行し、ゲル全体が均一な電場になる。
- 個々のタンパク質は各々の移動度 u により分離される。(電荷、分子ふるいの効果)

タンパク質分子の非変性状態と変性状態を調べる

サブユニットや分子量に関する情報を得たい場合は、
タンパク質を変性させるとよい

Native状態

変性状態

単量体



2量体
(ホモ)



2量体
(ヘテロ)

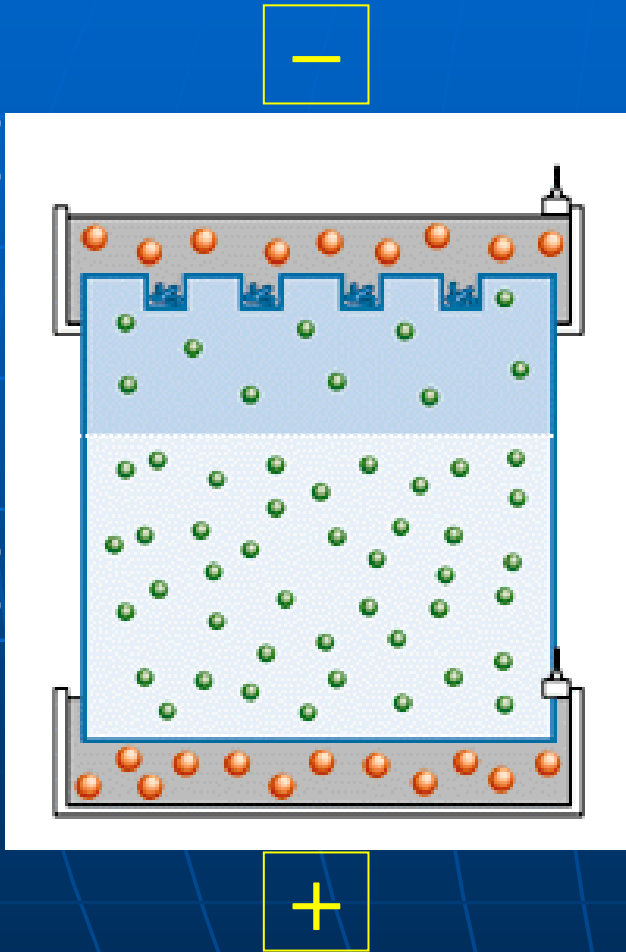


Native PAGE

SDS-PAGE

Native電気泳動(トリス・グリシン)

separating gel stacking gel



pH6.8 ではGlyの解離度が低く

$$u_{Cl} > u_{protein} > u_{Gly}$$

Gly pH 6.8 Cl⁻ : leading ion

Cl⁻ pH 6.8 Gly⁻ : trailing ion

Cl⁻ pH 8.3

Gly pH 8.3

pH8.3 ではGlyの解離度が高くなり
均一な電場となる。

Native電気泳動

stacking gel
separating gel



- 蛋白質は活性を保ったままの状態泳動される。
- 多量体蛋白質は、多量体のまま泳動される。
- 不溶性蛋白質は泳動できない。
- 活性染色が可能となる。（アミラーゼをアミロースとヨウ素で検出可能）
- 泳動後のタンパク質が酵素である場合、基質をゲルに処理すると反応産物が酵素のバンド付近で生成する様子が観測できる（in-gel assay）。
- 例えば、DNA結合蛋白質はDNAと結合した状態で泳動される。（gel shift assay）
- 蛋白質の移動度は分子量だけに依存しない。

SDS-PAGE (トリス・グリシン)

stacking gel
separating gel

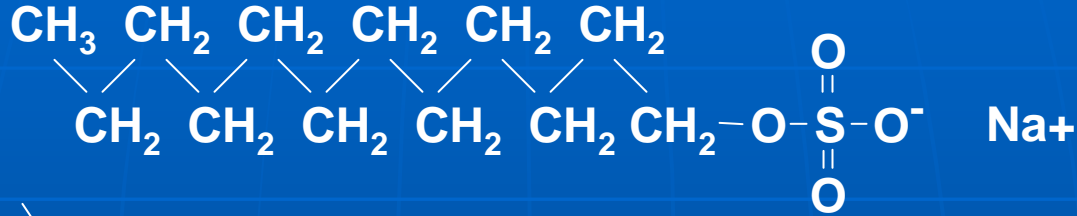


Stacking gel:	Tris-HCl (pH6.8), 6 - 18 % Polyacrylamide
Separating gel:	Tris-HCl (pH8.3), 6 - 18 % Polyacrylamide
Running buffer:	Tris-HCl (pH8.3), Glycin

サンプルには色素、Glycerol、SDSを加え熱変性させる（蛋白質の変性・可溶化）。

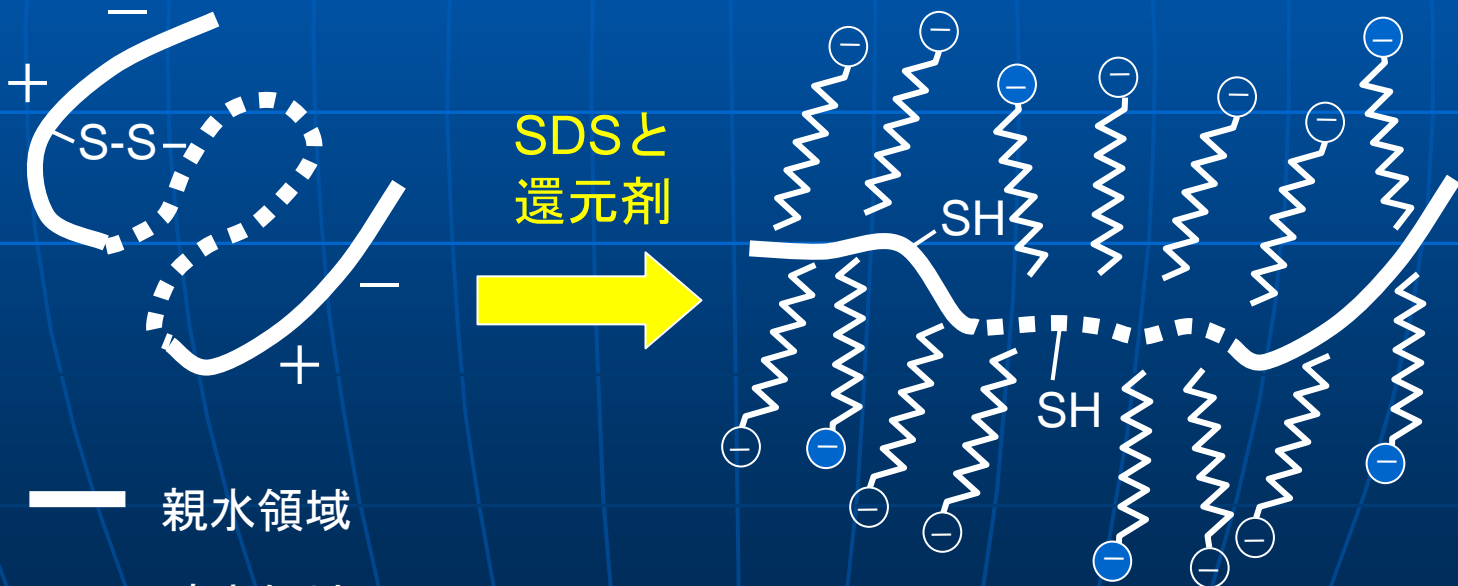
蛋白質のSDS-PAGE

Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis



疎水基

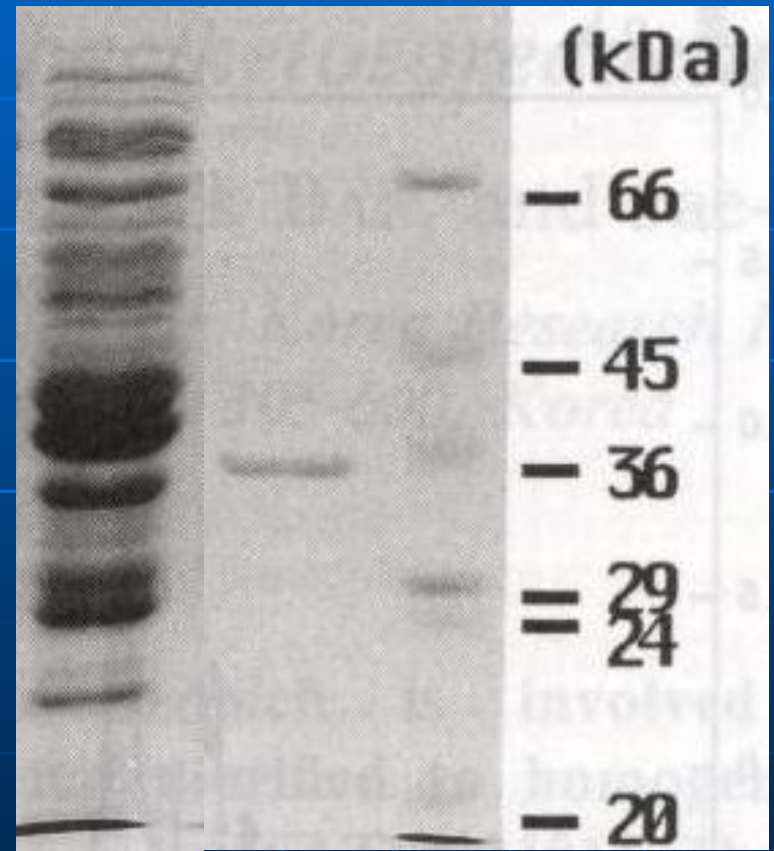
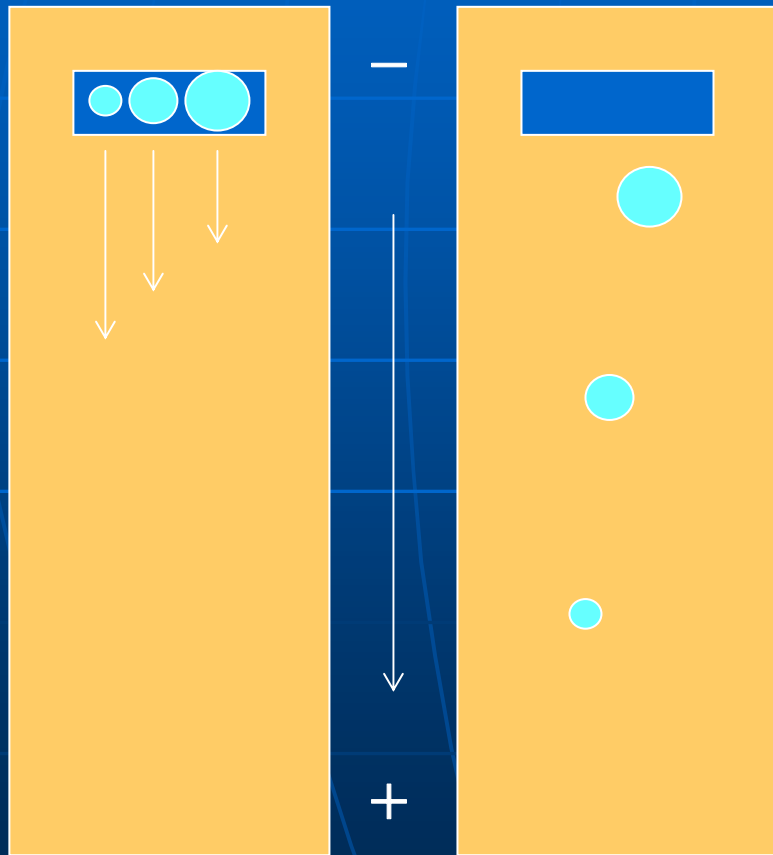
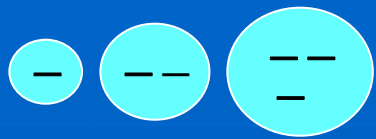
親水基



— 親水領域
- - - 疎水領域

SDS : タンパク質 = 1.4 : 1 (最高)
ポリペプチド本来の電荷の効果は10%以下となる。

蛋白質のSDS-PAGE



ただし、ジスルフィド結合に注意。

SDS-PAGE

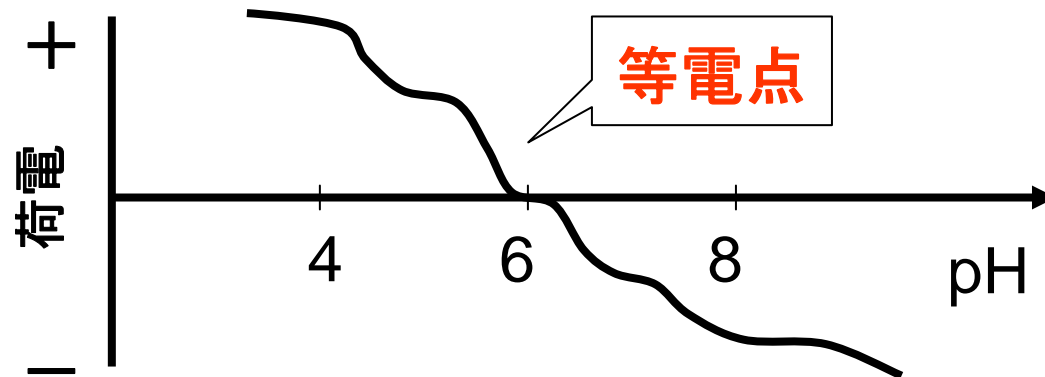
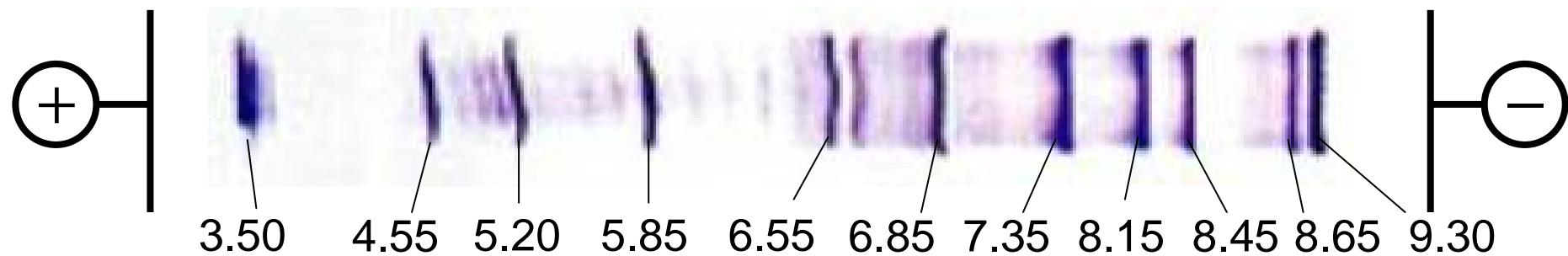
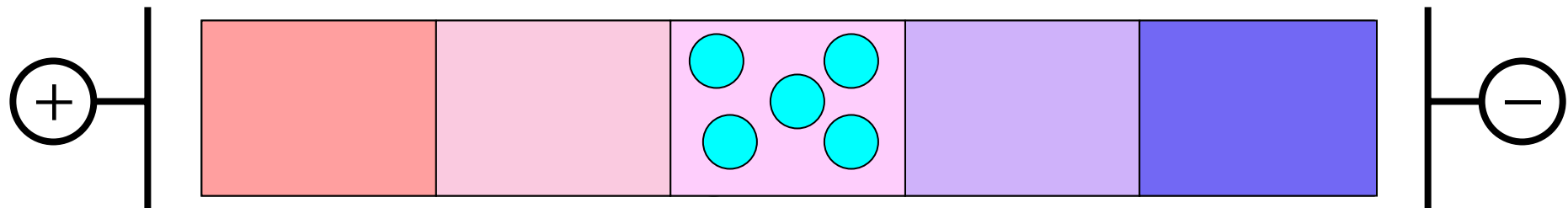
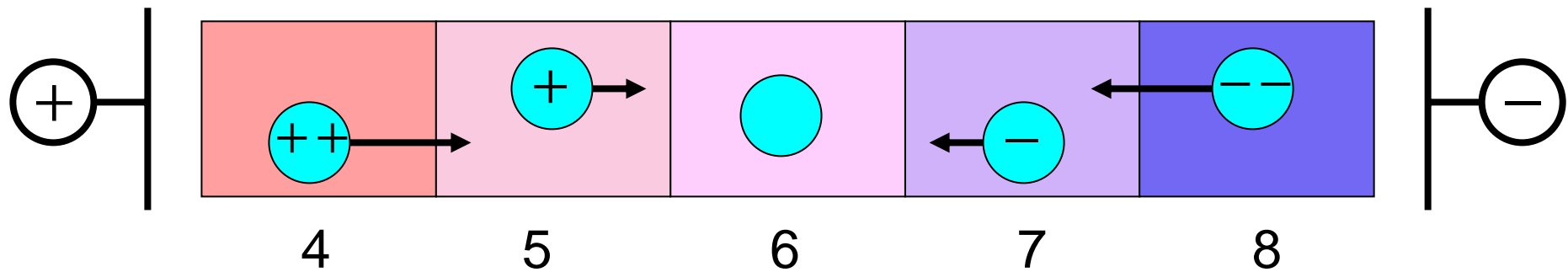
stacking gel
separating gel



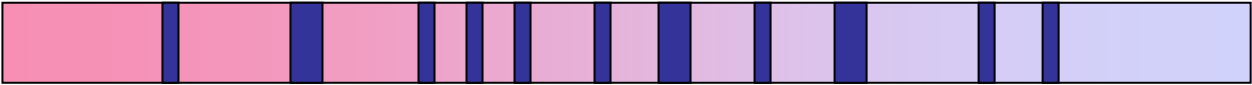
- 蛋白質は変性状態で泳動される。
- 多量体蛋白質は、分離された状態で泳動される。
- 不溶性蛋白質もSDSにより可溶化されて泳動できる。
- 活性染色はできない。ただし、SDSを緩衝液で洗うことでタンパク質の構造が復元できるならば、電気泳動後の活性染色は可能（in-gel assay）。
- 主に蛋白質の大きさによりのみ依存して移動度が決まる。

2次元電気泳動システム

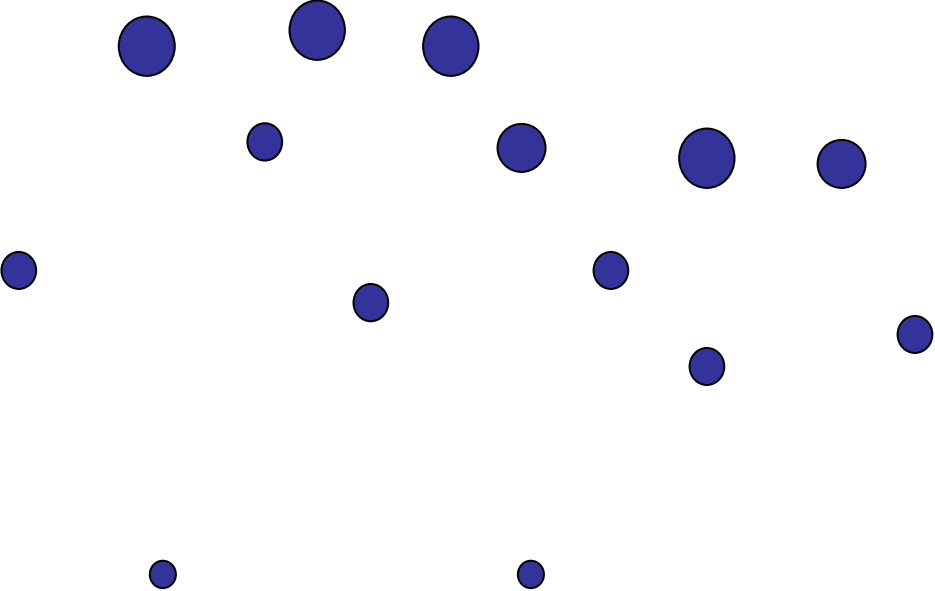




等電点電気泳動



SDS電気泳動



酸性pI 等電点電気泳動 塩基性pI

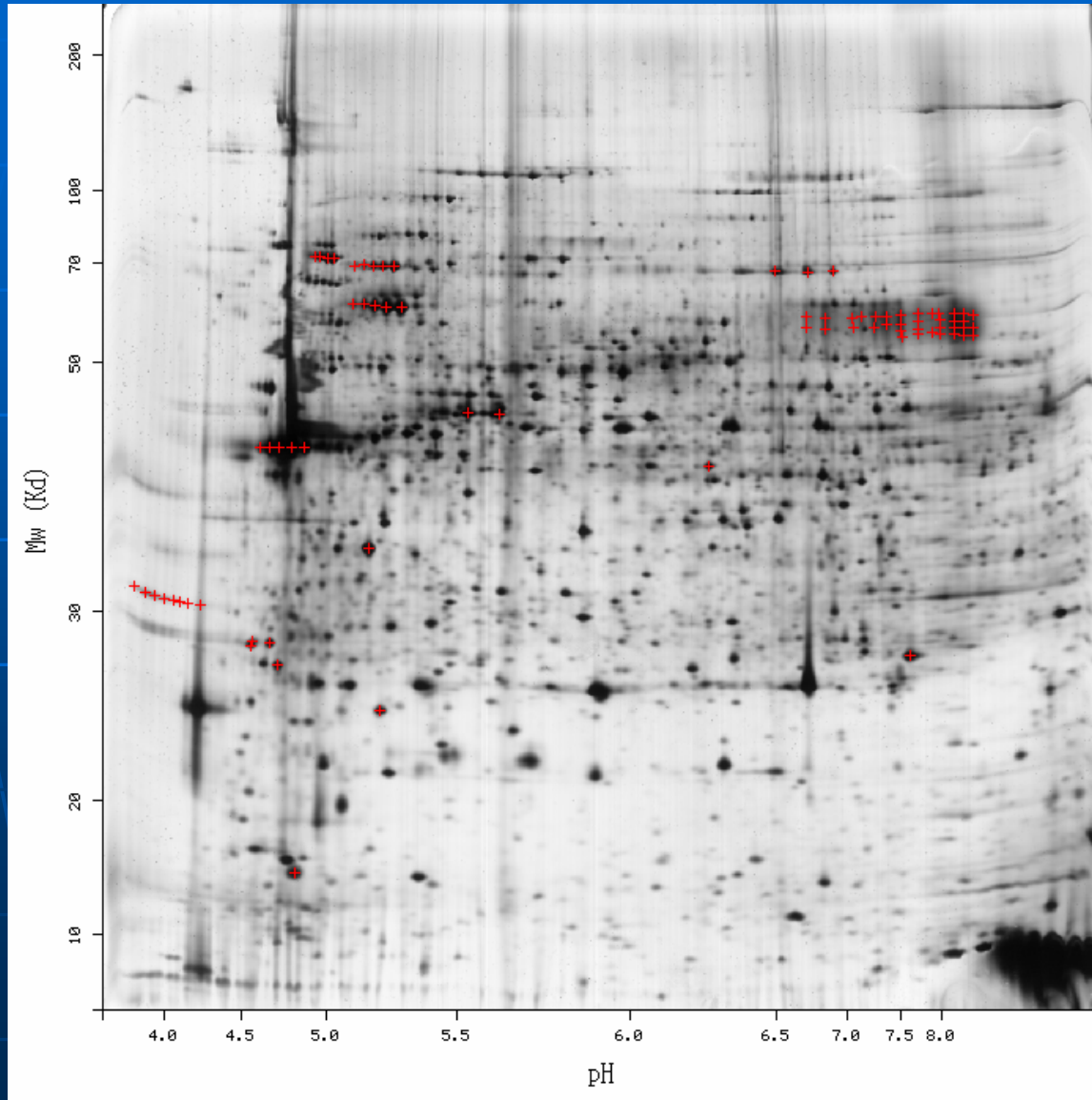
→

SDS電気泳動(分子量)

大

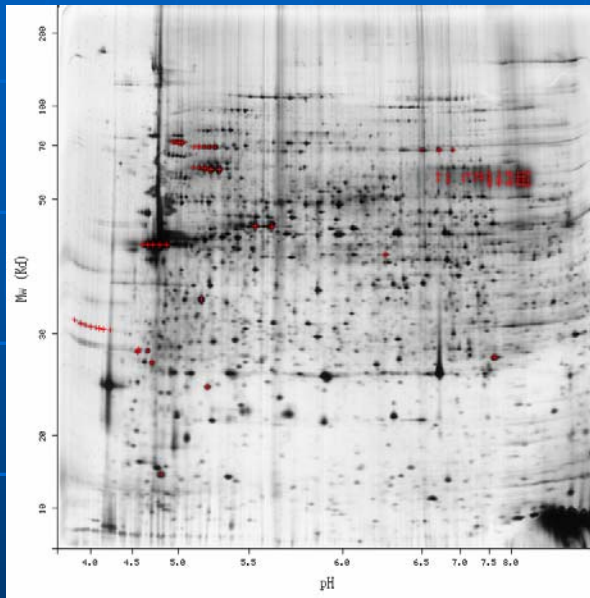


小

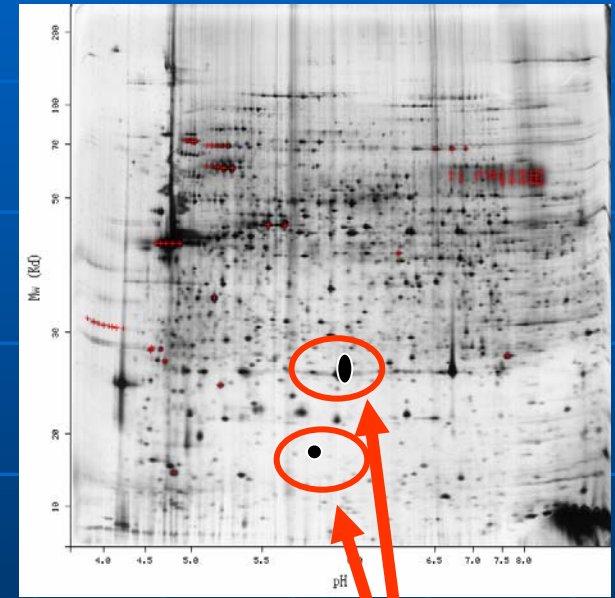


2次元電気泳動はプロテオーム解析にも有力な技術である

異なる状態における細胞内のタンパク質の発現パターンを比較できる。
検出された各スポットに含まれるタンパク質の断片配列を質量分析し、
既知の配列であればそれぞれを具体的なタンパク質に帰属できる。



状態 A



状態 B

発現量が増減(出現・消失)
するスポットに着目

染色

【非特異的染色】

タンパク質に結合する色素などで染色

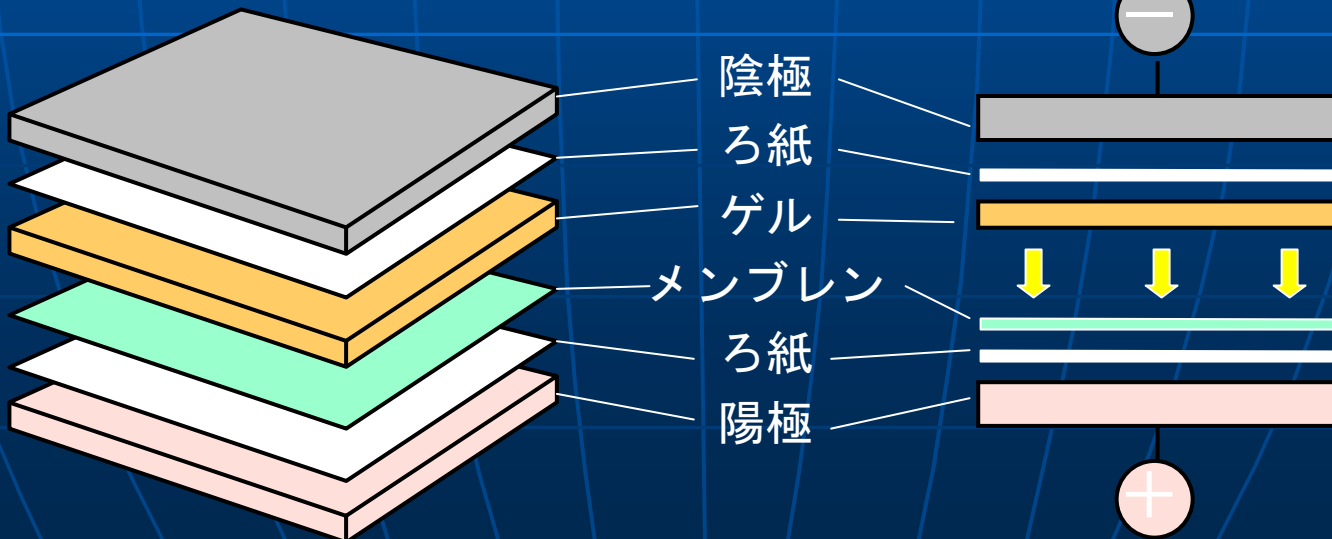
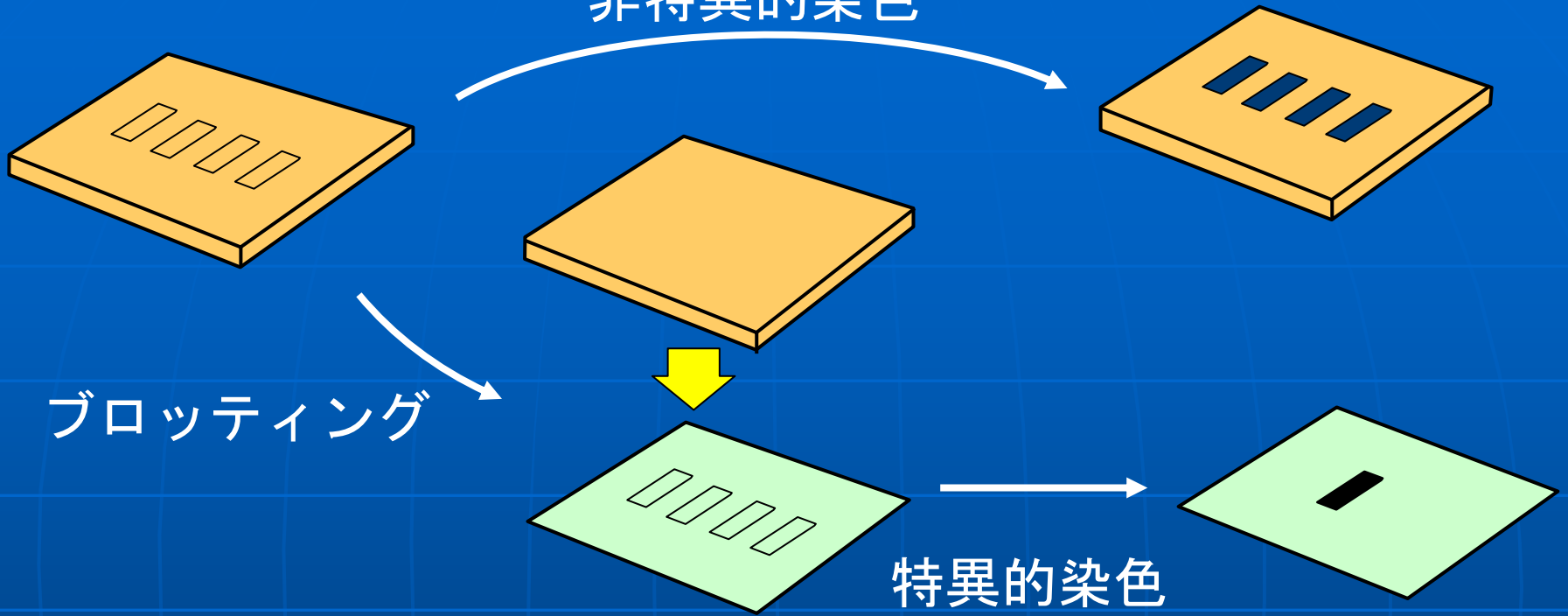
【特異的染色】

特定のタンパク質を染色する

生物活性を直接検出（活性染色）

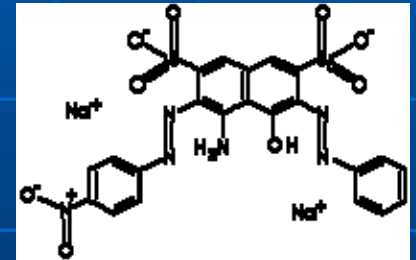
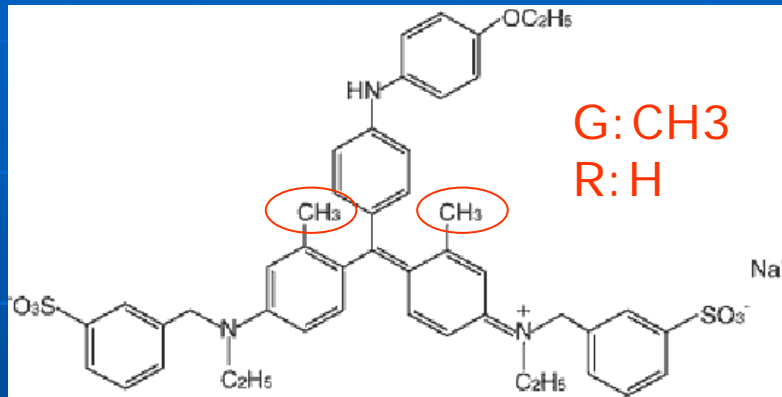
抗体を用いて特異的に染色（ウェスタンブロッティング）

非特異的染色

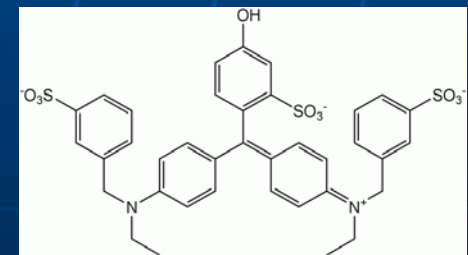


タンパク質の代表的な非特異的染色法

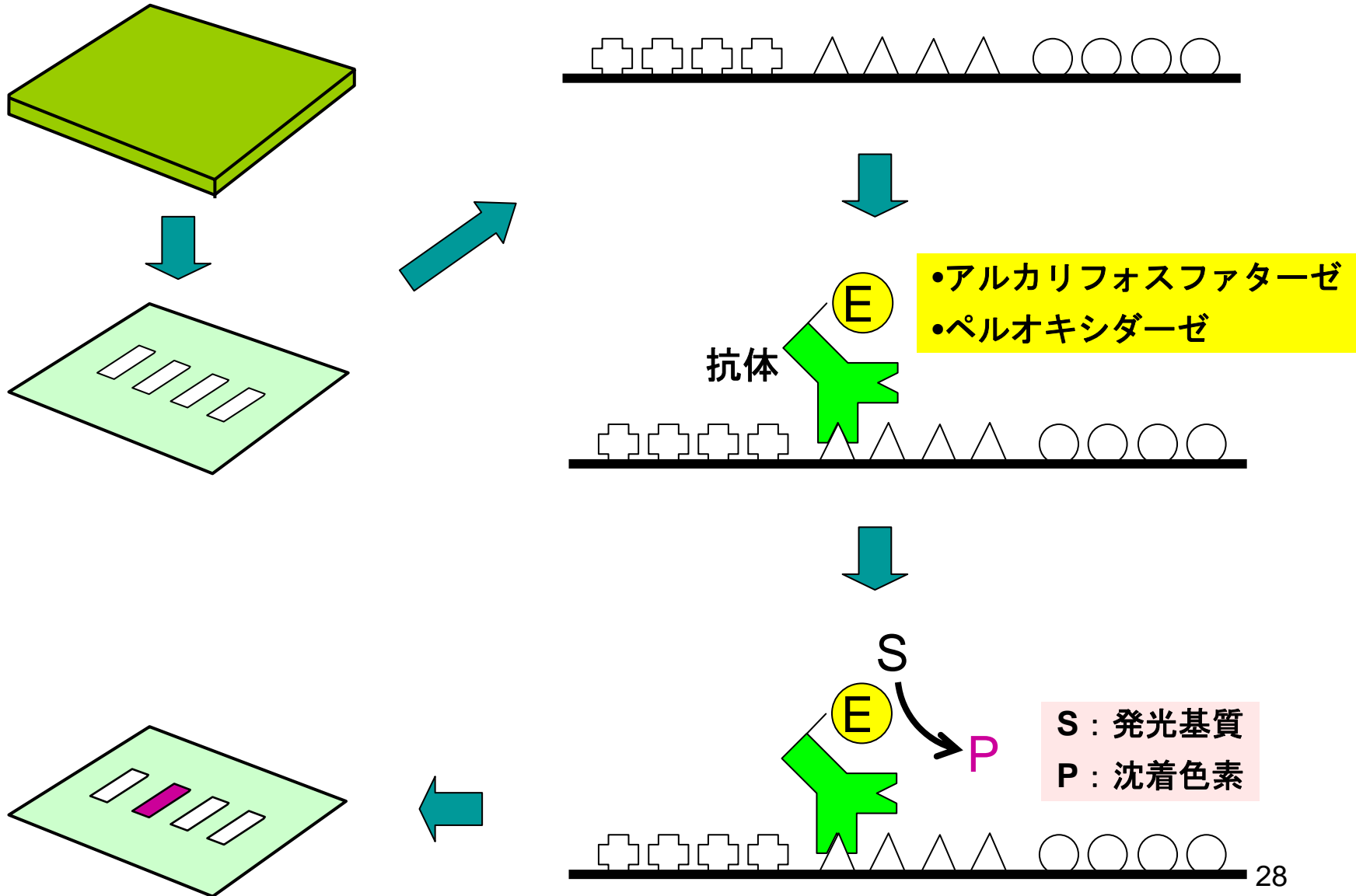
- **Coomassie Brilliant Blue G/R-250** 0.1 μ g
 - 最も感度が良いが、下記の染色法により特によく染まるタンパク質もある。



- **Amido Black 10 B** 1 μ g
- **Fast Green FCF** 1 μ g
- **Silver stain** 0.001 ~ μ g
 - 操作や廃液の処理が面倒だが、感度がよい。



タンパク質の特異的染色法の代表： ウェスタンブロッティングの原理



ブロッキングに用いる電気泳動装置
大昔の実験台を撮影したもの



非特異的染色

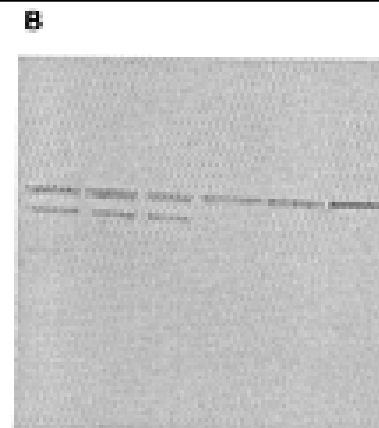
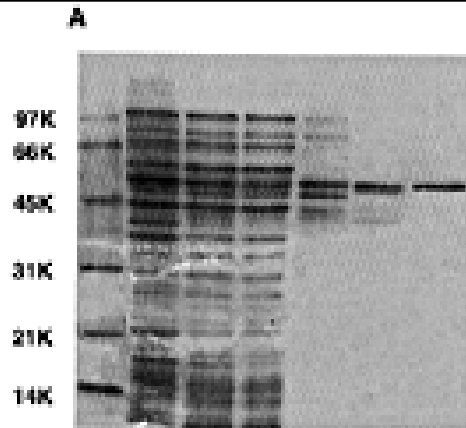
特異的染色



Coomassie Brilliant Blue (CBB)

活性染色

Silver staining (銀染色)



ウエスタン
ブロッキング

その他の考察

- Laemmliの不連続緩衝液系のほかに、ShapiroらとWeberらによる連続緩衝液法がある。両者の特徴を図書館で調べてみる。
- 核酸の電気泳動について、考えてみる。タンパク質の電気泳動法とどこが同じで、どこが異なるのか？

-
- タンパク質の分子構造や機能とアミノ酸残基の電荷との関係。
 - タンパク質の水溶性、水分子とタンパク質との関係。
 - キャピラリー電気泳動、ろ紙電気泳動、など他にも電気泳動の原理を用いた研究法は多い。タンパク質などの高分子に限らず、有機物を混合液から単離する(純品として取り出す)ために用いられる手法をまとめて勉強すると良い。

以上です。