

テクニカルノート ● ゲルからのタンパク質抽出法シリーズ(6)

染色後のタンパク質を手作り装置で電気泳動的に抽出する方法

戸田 年 総

(財)東京都老人総合研究所生化学部)

1. はじめに

アミノ酸分析やアミノ酸配列決定が、きわめて微量のタンパク質(ポリペプチド)で行えるようになったことや、培養細胞など限られた量の出発材料から特定のポリペプチドを単離する必要がある実験が増えたこと、電気泳動後の特定のタンパク質を高感度かつ特異的に検出することのできる酵素抗体染色法が確立されたことなどによって、タンパク質の分離精製手段(とくに最終段階)として、ポリアクリルアミドゲル電気泳動が利用されることが多くなってきた。しかし、固定・染色されたタンパク質をゲルから効率よく抽出する方法に関しては確立されたものがなく、各研究者がそれぞれに工夫を凝らしているのが現状である。

筆者らは、ブタ肝細胞内における肝型ホスホフルクトキナーゼ(PFK)の生理的分解中間体の単離・精製を行う際に、ISOTACHO/DALT系のポリアクリルアミドゲル二次元電気泳動法¹⁾を利用し、さらに¹²⁵I-標識後の分解中間体を再度精製する手段としてSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を利用した。そのため、最終的にペプチドマップを作成する際に、それらの¹²⁵I-標識ポリペプチドをゲルから抽出する必要が生じた。電気泳動的に抽出するための装置は、国内メーカーも含め数社から市販されているが、使用頻度を考慮すると高価であり、筆者らは、どの研究室でも見かけるようなごくありふれた材料を用いて装置を組み立て、短時間に95%以上のポリペプチドを回収することができた。この方法は安価であるばかりでなく、簡便かつ確実な抽出法であるので、固定・染色後のポリペプチドをゲルから抽出する段階で

苦勞をされている方の参考になればと考え筆を執った。

なお、10年ぶりに増補となった『生化学会編・続生化学実験講座2 タンパク質の化学上』においても、抽出法には言及しなかったため、そのまた増補のつもりでもある。

2. 試薬の調製

抽出には、下記の2種類の緩衝液を用いる。この系では、トリスをカウンターイオン(SDSやSDS化ポリペプチドとは逆向きに泳動される対イオン)、グリシンをトレーリングイオン(SDSやSDS化ポリペプチドよりも遅れて泳動されるイオン)としているので、pHは合わせないほうがよい。とくに塩素イオンなどの移動度の大きいイオンが添加されると、抽出速度は著しく遅れるので注意を要する。

- 1) 前処理用緩衝液: 25 mM トリス, 100 mM グリシン, 1% (w/v) SDS, 5% (v/v) グリセロール。
- 2) 泳動用緩衝液: 25 mM トリス, 200 mM グリシン, 0.1% (w/v) SDS。

3. 電気泳動法およびゲルの染色・脱色・保存法

電気泳動は、ポリアクリルアミドゲル中で行うものであれば、ディスク電気泳動法²⁾、SDS電気泳動法³⁾、等電点電気泳動法⁴⁾、等速電気泳動法^{5,6)}など、ほとんどすべての方法に適用できる。なお、本抽出法は、染色によってタンパク質の位置を確認したうえで、その部分を切り取って抽出することを前提にしているため、たとえ未変性条件で泳動した場合でも、未変性のまま抽出することは考えていない。染色法も、基本的にはどのような方法でもよいのであるが、グルタルアルデヒドなどの架橋性試薬を用いる方法や、染色中にタンパク質がゲル中から失われる方法は適さない(筆者らの経験では、銀染色法も適さない)。筆者らは、主にクマジー青 G250 を用いている。以下にその染色法を述べるが、詳しくは前述の『続生化学実験講座』を参照されたい⁷⁾。

ゲルを 0.06% (w/v) クマジー青 G250, 3.4% (w/v)

An electrophoretic elution method of stained protein with a hand-made apparatus

Tosifusa Toda (Department of Biochemistry, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology, 35-2 Sakaecho, Itabashi-ku, Tokyo 173)

投稿受付: 1987年5月13日

ゲルからのタンパク質抽出法シリーズ(6)

スルホサリチル酸, 5% (w/v) トリクロル酢酸, 50% (v/v) エタノール中に1時間以上浸漬して染色し, 10% (v/v) 酢酸, 20% (v/v) エタノール中で脱色する。この脱色液中に長期間放置すると, タンパク質に結合した色素も徐々に除かれるので, できるだけ早く, 目的のタンパク質を含む部分を切り取り, 下記の前処理および抽出を行う。数日~1週間程度, ゲルを保存する場合, 10% (v/v) 酢酸, 20% (v/v) エタノール中に移しておく。止むをえず1週間以上放置する場合には, この液にさらに2% (v/v) 程度の過塩素酸を添加しておく。通常よく用いられる5% (v/v) 酢酸中では, 染色パターンに変化はないものの, タンパク質は失われていくので注意を要する。なお, できるだけ色素を除いておきたい場合には, 目的とするタンパク質部分のゲルを試験管などに移し, 10% (v/v) 酢酸, 50% (v/v) エタノールを加えて一晩振とうする。

4. ゲルの前処理 (タンパク質の再可溶性)

抽出に先立って, 以下の手順でゲルを前処理する。まず, ゲルを蒸留水で洗う(20分ごとに液を新しくし, 1時間振とうする)。つぎに, 洗浄液を除き, 前記の前処理用緩衝液(ゲルの約5倍容)を加え, 室温で25分間振とうする。さらに, 沸騰水浴中で5分間加熱する。なお本方法は, 染色後のタンパク質を SDS で再可溶性化して抽出するために至適化されたものであるため, 未変性タンパク質の抽出には向かない。等電点が酸性のタンパク質ならば, 染色前にゲルを切り取り, SDS を含まない泳動用緩衝液中で泳動抽出することも可能であるが, 泳動時間および回収率はタンパク質によって異なるので, 予備実験を行って確かめたらうでで実施することをお勧めする。

5. 装置の組み立てと泳動抽出の手順

図1に, 装置の構造を示す。材料において注意すべき点は, ミクロ遠心管と透析チューブの密着性である。筆者らが使用したザルスタット社製ミクロ遠心管 72-699 (国内ではアシストチューブ 0.5 ml という商品名で売られているもの) と, ユニオンカーバイド社製ビスキングチューブ 8/32 (輸入発売元は三光純薬) の組み合わせなら問題はない。(少々きついものを無理に押し込む程度がよい。)

まず, 透析チューブを約5cmの長さに切って水で膨潤し, 先端を切り落とす前のミクロ遠心管にかぶせて, 口を少し広げる。つぎに, 図のように遠心管の先端を切

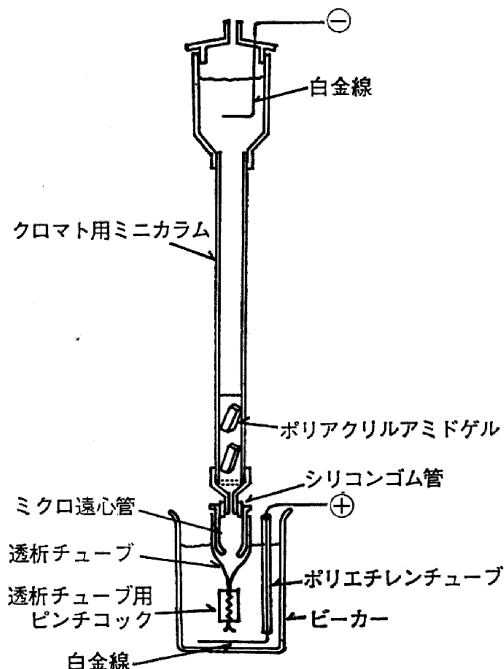


図1 手作りの電気泳動抽出装置

り落として, 今度は根元までしっかりとかぶせる。これを1% (w/v) SDS 溶液に1晩以上浸漬し, 洗浄する。(長期間保存する場合, この洗浄液に浸したままにしておくとうい。)

使用時には, 蒸留水で十分に洗浄し, 下端を透析チューブ用の締め具で閉じる。漏れないように閉じられるものであれば何でもよいが, 筆者らはスペクトラム社製のクローサー 132734 を使用している。先端に約5mmのシリコンゴム管(内径3mm, 外径6mmのもの)をつけ, よく洗っておいたクロマトグラフィー用ミニカラム(筆者はバイオラド社製のエコノカラム 0.7×10cmを使用)に, 約0.5mlの前処理用緩衝液を流し, フィルターおよびその下流の空気を除く。透析チューブを取り付けたマイクロ遠心管内にも同じ緩衝液を満たし, 空気が入らないように注意しながら両者を連結する。カラムをスタンドに固定し, 下端をピーカーに入れて, 透析チューブがつかる程度まで泳動用緩衝液を満たす。前処理されたゲルと, 前処理に用いた緩衝液を共にミニカラムに入れる。界面を乱さないように注意しながら, リザーバーの途中あたりまで泳動用緩衝液を満たす。図のように白金線を固定する。なお, 陽極側は, 先端だけが露出するようにポリエチレンチューブなどで被覆しておく。直流の定電流1mAで, 約1時間泳動する。この時, ク

ゲルからのタンパク質抽出法シリーズ(6)

マジー青 G250 が残ったゲルの場合、透析チューブの先端に濃縮された色素が見えるので、次の分取の際の目安となる。

6. 抽出液の分取

ゲルから抽出され、透析チューブの下端で濃縮されたタンパク質は、つぎの手順で取り出す。まず、ビーカー内の陽極液をアスピレーターなどで静かに吸い出す。つぎに、ミニカラム内の液を同様に吸い出す。マイクロ遠心管をミニカラムから取り外し、マイクロ遠心管内の液を試験管などに移す。(泳動が良好な場合、この画分にはタンパク質は存在しないはずであるが、念のために分取しておく。なお、クマジー青 G250 も同時に抽出濃縮された場合、タンパク質は青色の層に含まれているので、その層を吸い取らないように注意する。)最後に、透析チューブを破損しないように注意しながらチューブ内の抽出液を吸い出し、別の試験管に移す。抽出液の量が多すぎて差し支えない場合や、タンパク質の損失を最小限にしたい場合には、少量の泳動用緩衝液でチューブ内を洗い、タンパク質を回収する。ラジオアイソトープで標識されたタンパク質を抽出した場合には、透析チューブとマイクロ遠心管は放射性不燃物として廃棄処分する。

7. 実施例

筆者らは、哺乳動物の肝における解糖調節酵素の一つである PFK が、肝細胞内でどのように分解されていくのかを知るために、肝細胞内における生理的な分解中間体の精製および同定を行った¹⁾。タンパク質分解酵素阻害剤(アンチパイン、ロイペプチン、ペプスタチン、PMSF、および EDTA)を含んだ緩衝液中でブタ肝 100 g をホモジナイズし、タンパク質を抽出した。抗 PFK 抗体をリガンドとする免疫親和クロマトグラフィーによって、肝型 PFK とその分解中間体を濃縮し、調製的二次元電気泳動 (ISOTACHO/DALT 系) によって、84 kDa の PFK と、68 kDa, 64 kDa, 56 kDa, および 51 kDa の 4 種の分解中間体を単離した。クマジー青 G250 染色された個々のポリペプチドスポット部分を切り出し、一部はニトロセルロース膜に転写して酵素抗体染色を行った。残りはゲル中で Elder の方法⁸⁾に従って ¹²⁵I-標識し、未反応の試薬を洗い流した後、ゲル切片を直接ゲル上端の試料溝に落とし込んで SDS 電気泳動を行った(標識反応中に生じた非生理的分解物および残留した

未反応試薬を除去するため)。このとき、空きレーンにそれぞれ 10, 20, 30, 40 および 50 μ g の精製 PFK (¹²⁵I-標識されていないもの)を内部標準タンパク質として同時に泳動し、染色像のデンストグラムより、おおよそそのタンパク質量を推定した(84 kDa が 35 μ g, 68 kDa が 7 μ g, 64 kDa が 15 μ g, 56 kDa が 20 μ g, 51 kDa が 25 μ g)。つぎにゲルをレーンごとに切断し、さらに 2 mm 幅に分画してガンマーカウンターにて β 線放射活性を測定し、クマジー染色によるピーク位置と放射活性のピーク位置が一致することを確認した。そのピーク画分のゲル切片中に含まれたタンパク質を、前述の手作り装置および方法で抽出した。回収率は、抽出前のゲルの放射活性と抽出後の抽出液中の放射活性より推定した。その結果、それぞれの ¹²⁵I-標識ポリペプチドの見かけの回収率は、95, 97, 100, および 97% であった。なお、マイクロ遠心管内から分取された液中には、ごく微量(5% 以下)の放射活性が検出されたものの、ゲル中の残留放射活性は検出されなかった。

以上のように、染色後のゲルから抽出された ¹²⁵I-標識ポリペプチドに対し、さらにタンパク質分解酵素 V8 による切断、ゲル濃度 20% による SDS 電気泳動、およびオートラジオグラフィーを実施した結果、68 kDa, 64 kDa, 56 kDa, および 51 kDa のポリペプチドが 84 kDa PFK の分解中間体であることが確かめられた。

- 1) Tosifusa, T. & Ohashi, M. (1986) *J. Biol. Chem.* **261**, 12455-12461
- 2) Davis, B.J. (1964) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **121**, 404-427
- 3) Laemmli, U.K. (1970) *Nature* **227**, 680-685
- 4) 宮崎 香, 斉藤 拓 (1981) 蛋白質・酵素の基礎実験法(堀尾, 山下編) pp. 333-347, 南江堂, 東京
- 5) 戸田年総, 長尾嘉信 (1978) 別冊蛋白質核酸酵素・等電点電気泳動と等速電気泳動(宇井, 堀尾編) pp. 126-136, 共立出版, 東京
- 6) 戸田年総 (1981) 蛋白質・酵素の基礎実験法(堀尾, 山下編) pp. 360-376, 南江堂, 東京
- 7) 戸田年総 (1987) 続生化学実験講座 2, タンパク質の化学上(日本生化学会編) pp. 15-31, 東京化学同人, 東京
- 8) Elder, J.H., Pickett, R.A., Hampton, J., & Lerner, R.A. (1977) *J. Biol. Chem.* **252**, 6510-6515