

濃縮ゲルだよ！タンパク集合

福田 青郎

生命活動というものを考えると、核酸が生命活動を担う作戦本部であるとすれば、タンパク質は生命活動を担う実働部隊と言える。生命活動の謎を解く上ではタンパク質の解析はとても大事であり、目的に応じてさまざまな解析手法がある。その中で最も有名であり基本的な実験法として、ポリアクリルアミドゲルを利用した電気泳動 (polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE) が挙げられる。特に不連続な緩衝液系を用いた discontinuous pH (DISC) 電気泳動法¹⁾に、ドデシル硫酸ナトリウム [sodium dodecyl sulfate, SDS (図1A)] を用いる SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (SDS-PAGE) を組み合わせた電気泳動法について、本会員で経験のない方はいないであろう。この不連続な緩衝液系の電気泳動では、まず濃縮ゲルでサンプル中のタンパク質が濃縮され、その後分離ゲルでタンパク質が分子量に応じて分離される。この濃縮ゲルでの作用のために、本電気泳動はタンパク質の高い分離能を示す。筆者の私見ではあるが、この濃縮ゲルでタンパク質が濃縮される原理は、芸術的と言っても過言ではないと思う。本稿ではこの不連続緩衝液系を用いた SDS-PAGE という実験法について、復習をかねて全体的な原理の解説を行いたい。

PAGEの進展

まず、さまざまな PAGE について概説させていただく。PAGE は 1960 年代初頭から報告がある。その後、SDS や尿素などの変性剤の利用、不連続緩衝液系の利用 (DISC 法)、塩基性タンパク質分離のための酸性緩衝液系の利用、広範囲分子量のタンパク質を分離するための濃度勾配ゲルの利用、さらにはこれらの組み合わせなど、さまざまな工夫がなされてきた (これらの原理は後述参照)¹⁾。またタンパク質の電荷はある pH (等電点) においてゼロになるという特徴を利用し、pH の勾配を付与したポリアクリルアミドゲルを用いた等電点電気泳動 (isoelectric focusing, IEF) が開発された。さらに 1975 年には、等電点電気泳動でタンパク質を分離した後、SDS-PAGE により分子量に応じて分離する二次元電気泳動が O'Farrell によって開発された²⁾。二次元電気泳動では 1000 を超えるタンパク質を分離することが可能であるため、プロテオーム解析のような、さまざまなタンパク質を含むサンプルの解析に有効である。LC/MS³⁾ の進歩により、最近のプロテオーム解析において二次元電気泳動が用いられることは少なくなっているが、基本的な実験法として知っておくべき手法である。このように一言で PAGE と言っても、さまざまな工夫が重ねられてきている。

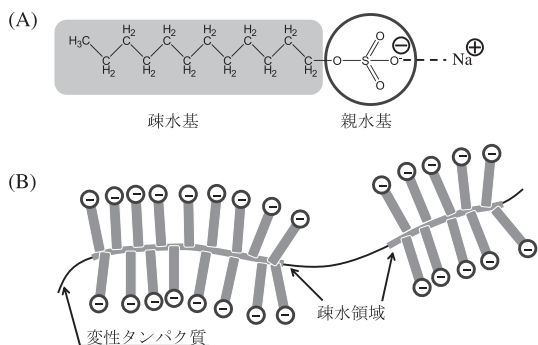


図1. (A) SDS の分子構造, (B) SDS-変性タンパク質の複合体

タンパク質の荷電

“電気”泳動を行う前提として、タンパク質が荷電する必要がある。タンパク質の荷電はそのアミノ酸組成や立体構造など、タンパク質の種類によっても大きく異なる。さらにこの電荷の符号や大きさは、媒質のイオン強度や pH により変化する。しかし陰イオン系界面活性剤である SDS 存在下では SDS 分子のドデシル基がタンパク質分子の疎水領域に付着するため、タンパク質自体の荷電のほとんどが打ち消され、ペプチド鎖長 (分子量) に応じて負に荷電する (約 1.4g-SDS/1g-タンパク質)^{2,3)}

(図1B). このSDS変性タンパク質は電気泳動を行うと陽極に向かって移動するが, 自由溶液中であれば分子量と電荷の比が一定であるため, タンパク質毎の移動度に差は出ない. しかし後述のポリアクリルアミドゲルのような支持体を利用した場合, タンパク質の分子量に応じた分離がなされる²⁾. ただしSDSは糖タンパク質や酸・塩基性タンパク質には比較的結合しにくく, 疎水性に富んだ部分が多いとSDSの結合量が増加するため, タンパク質の種類によっては分子量から予想される移動度を示さない場合がある. たとえばヒストンなどの塩基性タンパク質の場合, その正電荷をSDSでうち消すことができず, 移動度が小さくなることがある.

またタンパク質中のS-S結合もSDSの結合を阻害する. しかし事前に還元剤である2-メルカプトエタノールやジチオスレイトール (dithiothreitol, DTT) を加えることにより, タンパク質中のS-S結合は還元・切断され, 電気泳動時の移動度がポリペプチド鎖の分子量に依存するようになる⁴⁾. 特殊なケースとして, 耐熱性タンパク質は安定であるため, 熱処理や還元剤では完全に変性しないことがある⁵⁾. このためSDS-PAGE時に複数のバンドが現れることがある.

ポリアクリルアミドゲル

電気泳動におけるゲルには, 二つの重要な役割がある. 一つは安定な支持体となり, 熱による対流を防ぐことで

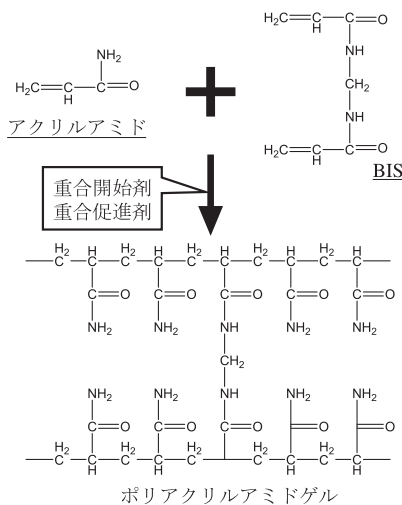


図2. ポリアクリルアミドゲルの作製

あり, もう一つは分子を分けるための“ふるい”となることである.

PAGEに用いられるポリアクリルアミドゲルは, アクリルアミドと *N,N'*-メチレンビスアクリルアミド (BIS) の共重合によって形成される. アクリルアミドとBISをバッファーに溶かし, フリーラジカル生成物質を加えることで, ところどころ架橋した網目状のゲルができる (図2)⁴⁾. このポリアクリルアミドゲルの中をタンパク質が通過するときの分子ふるい効果によってタンパク質はその大きさによって分離される. 大きいタンパク質ほど, ふるいの網目に邪魔されて遅く進むのである. またポリアクリルアミドゲルは, カルボキサミド基 (-CONH₂) を多く含み, 親水性が高い点も都合が良い.

ポリアクリルアミドゲルの分子ふるい効果はアクリルアミドとBISの合計濃度 (%T) によって決まり, 一般により高濃度のゲルほどふるいの目が細くなり, 低分子量のタンパク質の分離に適した担体となる. ただしアクリルアミド中のBISの比率 (%C) は約5%の時に網目が最小になり, それ以上高すぎても低すぎても, ふるいの目は大きくなると言われている³⁾. またタンパク質によって, 分離に最適な%Tは異なる. そのため通常のPAGEでは, 分離するタンパク質の大きさに合わせ最も分離能を発揮するように%Tを決定する. 広い範囲の大きさのタンパク質を含むサンプルについて分離を行う際は, アクリルアミド濃度勾配のあるゲル (密度勾配ゲル) を用いることで, タンパク質を効果的に分離する事が可能になる.

当然のことだが, PAGEでは必ずSDSのような変性剤が用いられるわけではない. 変性剤を加えずに行う電

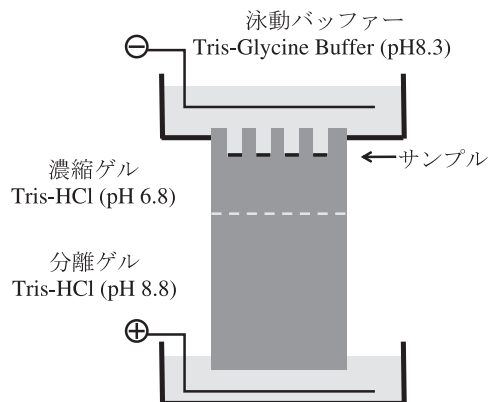


図3. 不連続型SDS-PAGE

電気泳動をNative-PAGEと呼ぶ³⁾。Native-PAGEではタンパク質の変性を行わないため、高次構造が維持される。そのためゲル中でも活性を保つ場合が多く、泳動後のタンパク質を酵素活性染色する目的で泳動されることもある。その反面タンパク質の移動度は、その分子量・電荷・高次構造などさまざまな因子に左右される。そのため解析したいタンパク質が+ -のどちらの極に移動するかをよく考え、電気泳動用のバッファのpHを選択する必要がある。たとえばヒストンなどの塩基性タンパク質を分離する方法として、酸性緩衝液系を利用したPAGEがある⁴⁾。この場合タンパク質を+に荷電させた状態で分離するので、電極のつなぎ方は図3とは逆になる。

濃縮ゲルでタンパク質が濃縮される原理

不連続緩衝液系を用いたPAGEによる分離では、ポリアクリルアミドゲルの性能以外にも、ゲルと泳動バッファにも素晴らしい仕掛けがある。前述の通りこのPAGEでは、pHとアクリルアミドの濃度が異なる濃縮ゲル (stacking gel) と分離ゲル (running gel) の2種のゲルを用いる (図3)⁶⁾。濃縮ゲル中でいったんサンプルを濃縮するため、サンプル溶液量が少々多くても高い分解能を示すことができる。それではなぜタンパク質は濃縮されるのだろうか？ まず濃縮ゲルはアクリルアミド濃度が低く、タンパク質を分離するふりとして働くことはない。濃縮の一番の仕掛けは、濃縮ゲル (Tris-HCl, pH6.8)・分離ゲル (Tris-HCl, pH8.8)・電極槽中の泳動バッファ (Tris-Glycine, pH8.3) という3種類のpHの異なった緩衝液系である⁶⁾。これら緩衝液系には陽イオンとしてイオン化したトリスヒドロキシメチルアミノメタン (通称トリス)、陰イオンとして塩化物イオンとグリシン由来のグリシネートイオンが含まれる。電気泳動開始後、濃縮ゲル中にサンプルが入った時、サンプルおよびバッファ中のトリス (pK_a 8.1) はpH6.8ではプロトン化するため陰極側に移動する。泳動バッファ中のグリシネートイオンも陽極側の濃縮ゲルの中に入り込むが、ゲル中の塩化物イオンはpHによらず移動度が大きいのにに対し、グリシンはpH6.8では両性イオン化する (ただしわずかに負に荷電している) ために移動度が著しく小さくなる。その結果、濃縮ゲル中に塩化物イオンのゾーンとグリシンのゾーンができ、その中間をタンパク質が移動することになる (移動度: 塩化物イオン > タンパク質 > グリシン)^{1,3)}。これら各ゾーンの境界で一時的にイ

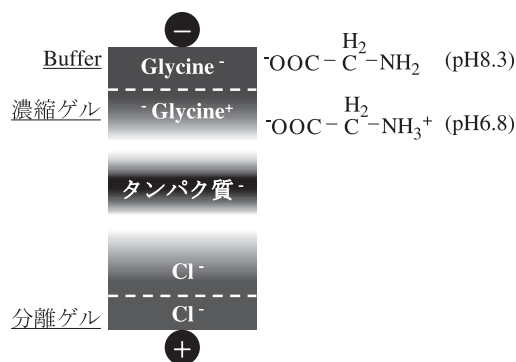


図4. 濃縮ゲル中のイオンの挙動

オンが不足するが、イオンの流れ (電流) はゲル中のどこでも均一なので、濃縮ゲル中のグリシンとタンパク質、塩化物イオンの各ゾーン間の抵抗と電圧が高くなり、後続のイオンは移動度の調節を受けることになる (図4)³⁾。つまり先頭の塩化物イオンの移動に合わせてタンパク質が、またタンパク質の移動に合わせてグリシンが引きつけられ、泳動が連続的に進行する (等速電気泳動)。結果として、最初に供したサンプル溶液量が少しくらい多かったとしても、高濃度に濃縮されることになる。

タンパク質が濃縮ゲルを出て分離ゲルに到着すると、事情が変わってくる。分離ゲル内はpHが高いため、グリシンはグリシネートイオンとなり、移動度はタンパク質よりも大きくなる [移動度: 塩化物イオン > グリシン (グリシネートイオン) > タンパク質]。その結果グリシンに追い越され「等速電気泳動」状態から解き放たれたタンパク質の移動度は小さくなり、分子ふるいにより分子量の大きさに応じて分離される。以上のようなイオンの挙動の変化の結果として分離の効率が上がるわけである。

またSDS-PAGEでは、電気泳動の進行具合を示すマーカーとしてプロモフェノールブルー (bromophenol blue, BPB) を、泳動するサンプル中に添加することが多い。BPBイオンは濃縮ゲル・分離ゲル中で塩化物イオンに次ぐ移動度を持つため、塩化物イオンに続くゾーンとして濃縮される⁴⁾。

トリス-トリシン緩衝液系の利用

SDS-PAGEにおける分離可能な分子量の範囲は基本的にアクリルアミドゲルの%Tで決まるが、前述の緩衝液系中のグリシンをトリシンに変更することによっても変化する^{2,7)}。このトリス-トリシン緩衝液系では、トリ

ス-グリシン緩衝液系に比べてより小さな分子量のタンパク質が分離可能になる。これはグリシンに比ベトリシンの移動度が大きいことに由来する。濃縮ゲル中ではトリス-グリシン緩衝液系同様、「等速電気泳動」状態で最後尾を移動するが、分離ゲル中に入ったトリシンは、グリシンでは追い越すことのできなかった低分子量タンパク質を追い越してしまう⁷⁾。追い越されたタンパク質は「等速電気泳動」状態から解き放たれるため、トリス-グリシン緩衝液系では分離されなかった低分子量タンパク質も分離が可能になる。ただし濃縮効果はグリシンの方が高いため、分解能はトリス-グリシン緩衝液系を利用した方が高くなる。そのため必要に応じて緩衝液系を使い分けるのが良い。

おわりに

SDS-PAGEはタンパク質を研究する人間なら誰もが扱う手法である。しかしそれだけに原理の理解がおざなりになっている人なども少なくないのではないだろうか？ かく言う筆者も学生時代などは、タンパク質の精製のために散々SDS-PAGEを行ったにもかかわらず、分子ふるいの話はともかく濃縮の原理などロクにわかっていなかった。後に濃縮の原理を知って、考案した人(ち

なみにDISC法は1964年、DavisとOrnsteinにより示されており、今回紹介したような現在広く用いられているSDS-PAGEは、Laemmliの手法に準じている⁸⁾はすごいなあとしきりに感心したことを覚えている。また現在筆者の所属する研究室でタンパク質の精製実験をよくやっている学生に原理を尋ねてみたが、やはり濃縮の原理は理解していなかった。本会の会員の皆様も同様だとは言わないが、「使用例が多い割に原理が十分理解されていない実験」として順位付けすると、上位に来るのは間違いないと思われる⁹⁾。本稿がSDS-PAGEというタンパク質解析の原理を再確認する機会になれば幸いである。

文 献

- 1) 日本生化学会編：新化学実験講座1 タンパク質I, p.347, 東京化学同人(1990).
- 2) 長谷俊治ら編：タンパク質をつくる, p. 42, 化学同人(2008).
- 3) 西方敬人：バイオ実験 イラストレイテッド ⑤タンパクなんてこわくない, p. 13, 秀潤社(1997).
- 4) 岡田雅人ら編：改訂第3版 タンパク質実験ノート(下), p. 17, 羊土社(2004).
- 5) Fukuda, W. *et al.*: *Archaea*, **1**, 293 (2005).
- 6) Conn, E. E.ら：第5版 生化学, p.75, 東京化学同人(1988).
- 7) 戸田年総ら編：タンパク質研究なるほどQ&A, p. 92, 羊土社(2005).