

一発分析？ 二次元電気泳動とは

山本 佳宏

生体で生成するタンパク質を単一分離する技術は経験とノウハウが必要とされる。タンパク質の精製にはカラムクロマト法とともに電気泳動法が広く用いられている。

電気泳動法では、SDS-PAGEを代表とする分子量での分離が広く用いられているが、今回はまず、タンパク質の等電点の差を利用して分離する等電点電気泳動から紹介する。現在、等電点電気泳動を直接実験に利用することは少なくなっているが、SDS-PAGEと組み合わせた二次元電気泳動は、使用目的、操作手順をよく考えれば、コストパフォーマンスに優れた定量、精製法であり、近年、急速に進歩するLC/MS解析などの高分解能解析の前処理としての利用にも有効であろう。

タンパク質の等電点 (pI: isoelectric point)

等電点は、アニオン、カチオン双方の官能基をもつ分子の電荷平均が0となるpHである。

アミノ酸はアミノ基とカルボキシル基の両方を有する化合物であり、一般にアミノ基をカルボキシル基より多

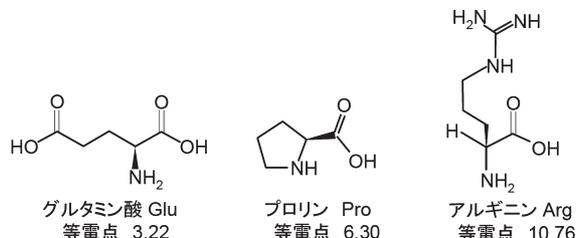


図1. 代表的なアミノ酸の構造。アミノ基とカルボキシル基に注目。

く持つアミノ酸は等電点が高く、カルボキシル基をアミノ基より多く持つアミノ酸は等電点（表1、図1）が低くなる。

タンパク質の等電点は、アミノ酸配列（アミノ酸組成）を計算することで、予測することが可能である¹⁾。

ゲノム情報から、タンパク質の分子量、等電点を予測できるが、この情報が得られることによりタンパク質の解析が飛躍的に容易になったことはバイオテクノロジーの大きな成果であろう。

電気泳動の歴史

溶媒中に電圧を加えると、電界内において負（-）に荷電した分子は陽極に向かって、正（+）に荷電した分子は陰極に向かって移動する。

この原理を応用したタンパク質分離法¹⁾として、図2で示すような高圧濾紙電気泳動、タンパク質の吸着を抑える支持体として改良したセルロースアセテート膜電気泳動が開発されている。

この方法では、タンパク質の等電点とアルカリ緩衝液（一般にはベロナール緩衝液pH8.8）の荷電量の差によ

表1. アミノ酸の等電点

アミノ酸	分子量	等電点
アスパラギン酸	133.10	2.77
グルタミン酸	147.13	3.22
システイン	121.16	5.05
アスパラギン	132.12	5.41
フェニルアラニン	165.19	5.48
グルタミン	146.15	5.65
チロシン	181.19	5.66
セリン	105.09	5.68
メチオニン	149.21	5.74
トリプトファン	204.23	5.89
バリン	117.15	5.96
グリシン	75.07	5.97
ロイシン	131.17	5.98
アラニン	89.09	6.00
イソロイシン	131.17	6.05
トレオニン	119.12	6.16
プロリン	115.13	6.30
ヒスチジン	155.15	7.59
リシン	146.19	9.75
アルギニン	174.20	10.76

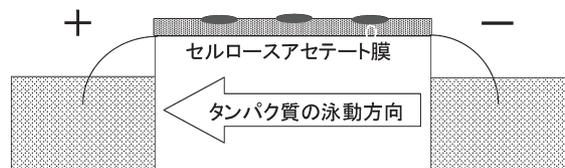


図2. セルロースアセテート膜電気泳動

り移動度が定まることを利用し、等電点の異なるタンパク質を膜上で分離することができる。

タンパク質と担体の吸着を避けるために、アルカリ緩衝液によりタンパク質を負に荷電させていることから緩衝液のイオン強度が高くなると易動度は遅く(拡散しやすく)なるが分離はシャープになる。セルロースアセテート膜電気泳動の分離を高めるには、高イオン強度、高電圧で短時間に泳動することが望ましいが、オームの法則により、高イオン強度では抵抗が低く、高電圧と併せて高電流が担体に流れることから、ジュール熱が発生する。過度の熱量は担体からの水分の蒸発、無理をすると発火の原因となり、高電圧には自ずと限界がある。

現在では分離能、分離条件が限定されることから、研究領域での使用は限定的であるが、手法が確立した再現性の高い分析法として臨床検査分野では広く利用されている。

等電点電気泳動 (IEF: isoelectric focusing)

安定なpH勾配を形成できれば、電気泳動により移動するタンパク質は等電点で停止し、分離が可能になる。これを実現したのが1960年代後半に開発された合成両性担体である。

現在市販されている両性担体は電圧を印加すると陰極側が低pH、陽極側が高pHとなる勾配が形成される。タンパク質は等電点と周囲に存在する両性担体の荷電量の差により移動するが、等電点となるpHで停止する。さらに支持体がポリアクリルアミドになり利便性が高くなると、研究領域での利用が高まった²⁾。

両性担体を用いるIEFで注意が必要な点は、等電点で分離できる範囲と両性担体の表記とは異なることである。たとえば、pH 3-10の表記のある両性担体のみを使用して等電点電気泳動(併せて二次元電気泳動)を行ってもpI 3-10のタンパク質をリニアに分離できるものではなく、pI 3.5-7ぐらいの範囲の分離解析となる。また、製造するメーカーの違いによってもこの範囲が異なることから、両性担体の個性を把握し、利用することが重要になる。なお、分離範囲の確認には、泳動後のゲルを直ちに切断し、pHメーターで計測することが提案されているが、実際の等電点を正確に把握することはそれほど簡単なことではない。

また、等電点電気泳動の支持体にはポリアクリルアミドゲルが利用されるが、支持体はタンパク質の移動に影響を及ぼさないように、3% T程度の低いアクリルアミド濃度でゲルを使用する。等電点電気泳動ゲルを染色し、タンパク質を検出する場合には、ゲルからの脱落を防ぐ

ため、TCAなどでタンパク質を変性する必要がある。

このように等電点の決定に技術(熟練)を要すること、タンパク質の染色、解析が困難であること、ゲルが非常に脆く、保存が困難なことなどから、電気泳動の主流は分子量分離を原理とするSDS-PAGEへと移行していった。

二次元電気泳動への展開

等電点電気泳動が再び脚光を浴びるのは、ポストゲノム時代と呼ばれ、網羅的解析が注目された2000年代である。一回の分析で1000以上のタンパク質を分離定量できる手法^{3,4)}として、IEFとSDS-PAGEを組み合わせた二次元電気泳動が注目され、大規模に導入されていった。

ここで二次元電気泳動がどのような利用が向いているか、考えてみよう。なお、タンパク質の抽出、S-S結合の切断などの前処理については目的を考えて効率よく手段を検討する必要がある。これはタンパク質精製技術の垂流だが、ここでは紙面の都合で割愛させていただきたい。

まず、IEFで容易に再現よく分離できる場所は酸性領域である。筆者は分析レンジとしてpI 3.5-7が最適であると考えている。

標的とする分子量は等電点電気泳動の「支持体はタンパク質の移動に影響を及ぼさない」という制約からおおむね100k Daを上限の目安にしている。

また、二次元電気泳動では、一次元目の等電点電気泳動終了後、等電点電気泳動に必要な両性単体、飽和に近い尿素などを除き、二次元目のSDS-PAGEに影響を及ぼさないようにゲルをSDS-PAGEで使用するサンプルバッファーで数十分振とう、洗浄し、これを複数回繰り返す。等電点電気泳動では低いアクリルアミド濃度のゲルを使用するため、低分子のタンパク質はこの操作中にゲルから溶出する可能性がある。この「バッファー置換時のタンパク質の溶出」のため、10k Da以下のタンパク質は定量解析には不安を感じている。

ここから、容易に分析できる等電点の範囲は3.5-7、余裕を見て4-6.5、分子量は10k Da-100k Daとなる。案外狭いと思われるかもしれない。ゲノムから標的タンパクが予想される場合、予測値が得られる。この範囲にあるタンパク質を分離するのであれば、それほど無理はないように思う。

これ以外の範囲は相応のノウハウが必要な領域である。多くの場合、標的となるタンパク質は糖鎖を持ち(アミノ鎖+糖鎖で巨大になる)、その等電点が高いことが往々にして生じる。

たとえば、標的とするタンパク質の等電点がpH 6-10の範囲であれば、一次元目に平衡に達する前に泳動を止

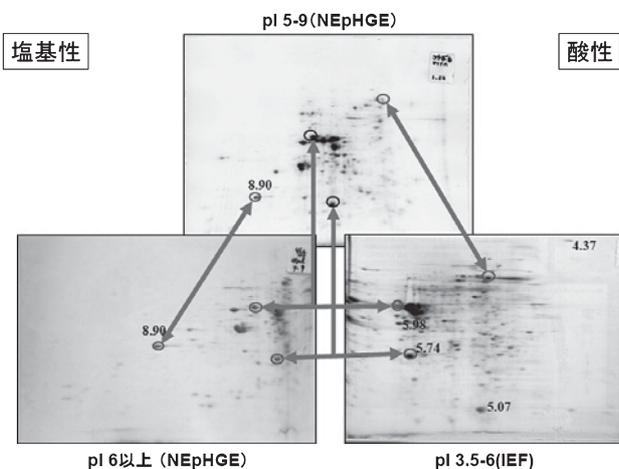


図3. 酸性、塩基性領域の二次元電気泳動例。試料：清酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)。

める非平衡pH勾配電気泳動 (NEpHGE) を利用することができる。図3にIEFとNEpHGEによる分離パターンを例示する。この分析例では、数は少ないがpI 8.90以上のスポットも検出されている。

また、特に低分子のタンパク質、ペプチドを分析するのであれば二次元電気泳動以外の分析方法が有効であろう。

分析例：タンパク質の分離、スポット比較

多くの地方公設試験研究機関では地域の清酒メーカーに優良な酵母を供給する目的で優良な清酒酵母を育種しているが、当チームでは酵母の機能解析に二次元電気泳動によるタンパク質解析技術を導入した⁵⁾。

図4に清酒酵母の分析例を示すが、高泡を形成する、きょうかい9号といわれる泡なし酵母、きょうかい901号、1501号の比較で、スポットとならず、等電点泳動方向に一本のシャープなバンドを形成するA、Bに顕著な差が認められた。

SDS-PAGEでの分子量マーカーと泳動距離から予測される分子量は100k Daを大きく超えるものである。分

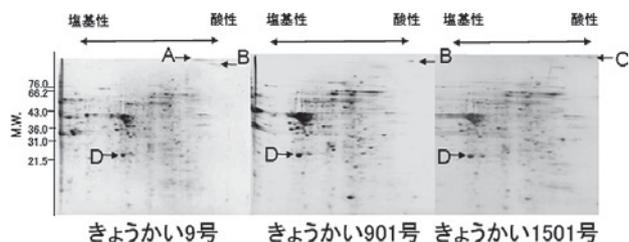


図4. 二次元電気泳動によるタンパク質発現解析。試料：清酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)。

子量マーカーのサイズを超える分子量予測ははなはだ不確実なものである。特に、このケースでは根拠のあるものではないが、それでも無理に画像解析ソフトウェアで相対移動距離 (Rf値) から分子量を計算すると1000k Daほどになり、あまりに大きな値に呆然とした。

アミノ酸配列の解析

発現に差があったタンパク質は何か。当然すぎる疑問であり、どのように同定するか、長い間、分析技術の開発が行われてきた。

二次元電気泳動が開発された1960年代末には分離、差分の比較は可能になっていたものの、その差分のスポット (タンパク質) の同定は容易なものではなかった。

タンパク質研究の分野では、複数のプロテアーゼで断片化したペプチドをN末端からエドマン分解し、遊離したPTHアミノ酸を分析することで、アミノ酸シーケンスを読み、全配列を決定していた。当初は手動で行われていたエドマン分解が自動化され、感度が向上しつつも、N末端から20残基程度しか分析できない手法では全配列を決定するには多大な時間、費用、工数が必要であった。

その後、DNA解析技術の進展と共に、一部のアミノ酸シーケンスからプローブを作成し、ライブラリーを構築、全長DNAシーケンスから全配列を容易に決定することができるようになる。

ゲノムライブラリーの利用

酵母では1995年、全ゲノム配列が決定され、データベースとして利用が可能になった。データベースが使えれば、同定だけであれば、全アミノ酸配列 (DNAシーケンスを含む) を決定する必要がなくなった。一部、5~10アミノ酸のシーケンスを決定するだけでデータベースから対応する遺伝子が検索できる。

これは画期的な進歩である。これで、二次元電気泳動で回収できるほとんどのスポットを同定できる!!!

いわゆるプロテオーム解析である。

特に、ここで例示する酵母は培養によりサンプルを大量に得ることができることから、複数枚のゲルを調製し、標的スポットを回収することで、ペプチドシーケンサで分析可能な量を確保、プロテアーゼで断片化し、エドマン型シーケンサで内部配列を決定することも容易である。

内部アミノ酸シーケンスを基にuniprotKBデータベースからBlast検索した結果、Spot Aは4か所のN-linked (GlcNAc) を持つGlycoprotein (糖タンパク質) であるYIL169C⁶⁾と、またSpot DはPhosphoproteinであるTPI1⁷⁾とホモロジーが高いことが分かった。

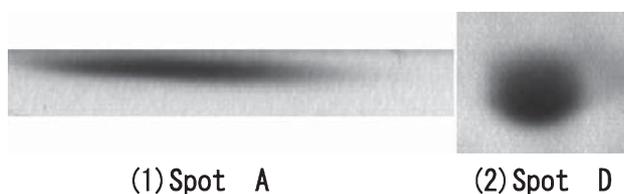


図5. きょうかい9号酵母で検出したタンパク質スポットの例.
Spot A YIL169C 99736 Da pI: 4.37
Spot D TPI1 26795 Da pI: 5.74
uniprotKBより *Saccharomyces cerevisiae* (Baker's yeast) を参照した.

YIL169Cのような糖タンパク質はSDS-PAGEでは一般論として、泳動方向にスミアな帯を形成するといわれているが、二次元電気泳動ゲルでは、図5 (1) のように等電点方向に広がる特徴的なバンドが認められる。一方Spot D, TPI1のスポットを図5 (2) に示す。こちらは二次元電気泳動のイメージである円に近い、いわゆるSpotである。

図5にスポットの位置関係を確認できるようにM. W., pIの計算値¹⁾を記載する。特に等電点方向のマーカには苦勞することが多いが、Spotの同定が進めば、これをマーカ代わりにおおよその等電点が予想できるようになる。

二次元目の電気泳動、SDS-PAGEで100k Daを大きく超える高分子量の位置にSpot Aが現れたことは、この糖鎖が影響しているのであろう。

それでも、このデータを得た当時、このような糖タンパク質の等電点がDNA配列からの予測値に近いことに驚きを感じたものである。

今回、2003年に投稿したアミノ酸配列データをネット上のデータベースで再解析し、数値を記載した。特に、Spot A, Bについては、解析した内部アミノ酸配列が一致する複数の遺伝子が追加されている。YIL169C以外に長さの異なるAWA1, YIL169C-like proteinなどがデータベースに加わり、当時と比べ、データ量、精度ともは

るかに充実していることを実感している。

現在では、二次元電気泳動を用いたプロテオーム解析技術は、新たな酒造用酵母の開発ツールとして、また、混入した異物を同定するなど、クレーム処理のための分析技術として活用している。

質量分析技術の発展

タンパク質のハイスループット同定技術として、ゲノムデータを基にしたペプチドマスフィンガープリンティング (PMF, peptide mass fingerprinting) などの質量分析法の進歩により微量のスポットでも同定可能な技術が開発され、微量の試料でも解析ができるようになっていく。

今から10年ほど前になるが、この技術でより簡単に分析できる、と勢い勇んでSpot AのPMF解析を試したものの、糖鎖の影響からそのスペクトルが理論値と大きく異なる結果となったこともある (いわゆる Mascot スコアが低い)。しかし現在では、分析前処理、データベースの充足、MS/MS解析によるシーケンス分析など、当時より急激に進歩した技術により解析が容易になっていることと思う。

実のところ、私自身、MS解析は現在、勉強中であり、近い将来、この技術を生物工学基礎講座で拝読できることを期待しているところである。

文 献

- 1) <http://web.expasy.org/protparam/>
- 2) Kunkel, H. G. *et al.*: *Journal of General Physiology*, **35**, 89 (1951).
- 3) O'Farrell, P. H.: *J. Biol. Chem.*, **250**, 4007 (1975).
- 4) 日本生化学会編: 生化学実験講座1タンパク質の化学, 東京化学同人 (1976).
- 5) 平野 久: 遺伝子クローニングのためのタンパク質構造解析, 東京化学同人 (1993).
- 6) <http://www.uniprot.org/uniprot/P40442>
- 7) <http://www.uniprot.org/uniprot/P00942>