

アガロースゲルを使ったネイティブ電気泳動法の開発

荒川 力

緒 言

電気泳動とは、電荷を持つ高分子をゲルあるいは溶液中で移動させる方法である。電場の存在下で正電荷を持つ高分子は陰極へ、負電荷を持つ高分子は陽極へと移動する。通常、核酸は負の電荷を、タンパク質はそのアミノ酸組成により正負どちらかの電荷を持つ場合が多い。電気泳動法はいくつか存在するが、中でもバイオの分野で特に汎用されるのはSDS (sodium dodecyl sulfate) - ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (SDS-PAGE) である。これは負電荷を持つ界面活性剤SDSが、タンパク質を変性させ、変性したタンパク質に強く結合する性質を利用している。SDSがタンパク質に結合することにより、すべてのタンパク質は負に帯電するため陽極へと移動する。よってSDS-PAGEでは、タンパク質はそれぞれの固有の電荷状態とは無関係に電気泳動される。ネイティブ電気泳動は、SDSを含まず中性付近の緩衝液を含むゲルを用いてタンパク質や核酸を移動させる方法であり、ネイティブ条件ではタンパク質の構造、またタンパク質と他分子との複合体が保存されていることから、分子間相互作用の分析が可能である。また酸性やアルカリ条件でも電気泳動可能であるが、そのようなpHではタンパク質が変性する恐れが生じる。市販されているネイティブ電気泳動用プレキャストゲル、たとえばTris-glycineを使った方法 (Invitrogenのネイティブ電気泳動セット) ではpH 8付近を使用するものが多く、そのpHで分子が正電荷を持つ場合陰極に、負電荷を持つ場合陽極へと移動する。もちろん低分子であれば、移動速度は速くなる。一般的に負電荷を持つ核酸やタンパク質には、この市販のTris-glycineを使った方法でうまく泳動ができる。しかしながら、理由は不明であるが正電荷を持つタンパク質はうまく泳動ができず、バンドのゆがみや広がりが生じ、移動度が正確に測定できないことが多い。この問題を克服するために、本方法を開発した¹⁾。

方 法

以前より、ネイティブ電気泳動で使える可能性のある緩衝液の組成が報告されている²⁾。その中で中性付近の組合せとして、30 mM His-30 mM MES, pH 6.1がある。そこで、このHis-MES緩衝液と主に核酸の分析で使用するアガロースゲルを用い評価した。アガロースを用いる利点は安全性と簡便性にある。アガロースは、アクリルアミドに比べてはるかに安全であり、アガロース溶液からゲル作製まで10分ほどしかかからないため、あらかじめ原液などを作り保存しておく必要がない。電気泳動装置は、核酸の解析に使われる模式図1Aに示した横型の泳動装置と、タンパク質の解析に使われる模式図1Bに示した縦型の泳動装置を使用した。横型の場合、たとえば16 cm × 16 cm程度の大きさの箱の中に高温(100 °C

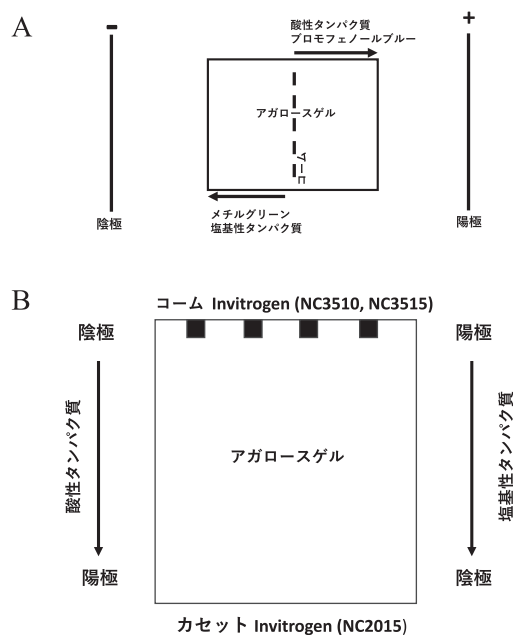


図1. 電気泳動の模式図。A: 横型電気泳動, B: 縦型電気泳動。

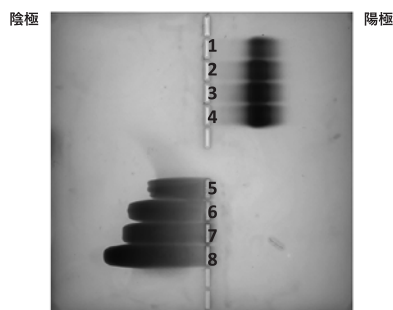


図2. 30 mM His-30 mM MESの横型電気泳動. レーン1-4, BSA. レーン5-8, リゾチーム.

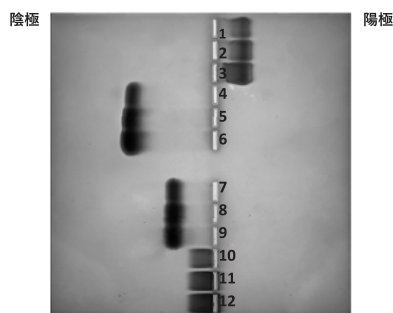


図3. 100 mM His-100 mM MESの横型電気泳動. レーン1-3, BSA. レーン4-6, リゾチーム. レーン7-9, キモトリプシン. レーン10-12, 牛血清由来の抗体.

付近)で融解した1 %程度のアガロース溶液を流し込み、厚さ2~8 mm程度のゲルを作る。流し込んだ直後に、中央にサンプルを注入するためのウェルを作るコームを入れる。図1Bに示した縦型の場合も同様に、融解したアガロース溶液を空のカセットに上から注入し、コームを挿入する。使い捨てのカセット、コームともにInvitrogenから購入できる。カセットの厚さは1.5 mmと薄いので、3 %程度のアガロース濃度になると、注入するのは困難である。コームはウェルが10個と15個のものがあ、どちらも困難なくサンプルをロードできる。

またローディング色素は、アガロースゲル作製時に用いた緩衝液に20 %のグリセロールと色素(プロモフェノールブルーかメチルグリーン)を添加したものを用い、評価したいタンパク質溶液と適当な比で混合して電気泳動試料とした。

結 果

まず、30 mM His-30 mM MES緩衝液、1 %アガロースを用いて実験を行った。図2に横型ゲルで、中央にBSAとリゾチームをロードし電気泳動した結果を示す。レーン1-4は異なる量のBSAを、レーン5-8は異なる

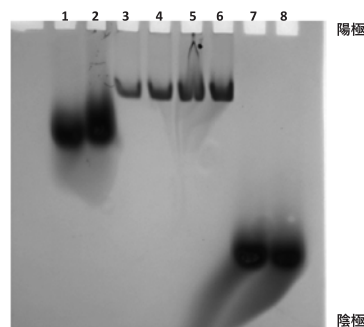


図4. 100 mM His-100 mM MESの縦型電気泳動. レーン1-2, キモトリプシン. レーン3-6, アデノウイルス. レーン7-8, リゾチーム.

量のリゾチームをロードしたものである。酸性タンパク質であるBSAとプロモフェノールブルーは、予想通り右側陽極へ、塩基性タンパク質リゾチームとメチルグリーンは左側陰極へと移動した。ここで問題なのは、リゾチームの挙動である。BSAはタンパク質量に関係なく一定の移動度を示したが、リゾチームの移動度はタンパク質量に依存しており、かつ、どのバンドの形状も尾を引くラダー状になった。市販のpH 8のプレキャストゲルでも塩基性タンパク質を陰極へと移動させると、ラダーになることが多い。

原因はよく分からないが、この問題は緩衝液濃度を上げると解消できることを見いだした。たとえば、100 mM His-100 mM MESを用いると状況は大きく改善される。図3には100 mM His-100 mM MESの結果を示す。レーン1-3はBSA、レーン4-6はリゾチーム、レーン7-9はキモトリプシン、レーン10-12は牛血清由来の抗体の結果である。どの場合もロードするタンパク質量と関係なく、同位置にバンドを形成した。牛血清由来の抗体はさまざまな抗体の混合物なので、単一なバンドを示さずスミアとなった。同じ条件では、縦型でもうまく泳動ができる。ただし、縦型の場合にはタンパク質の移動は一方方向しか観察できないので、タンパク質によって電極の配向を変える必要がある。分析する試料が、pH 6.1で正電荷を持つ場合は陰極方向へと移動するように、逆に、負電荷を持つ場合は陽極方向へと移動するように、電極を設定する。図4は上方を陽極、下方を陰極にしたもので、レーン1-2はキモトリプシン、レーン3-6はアデノウイルス、レーン7-8はリゾチームの結果を示している。リゾチームおよびキモトリプシンともに正電荷を持つので、下方の陰極方向へと移動する。アデノウイルスもこれらのタンパク質と同じ方向に移動していることから、正に帯電していることが分かる。

結 論

横型ゲルの利点は、高分子の電荷状態が分からなくても良いことである。縦型ゲルでは分離相が長いので、より大きな分解能が期待できる。また、ゲルが薄いので試料の量が少なくて済む。しかし、高濃度のアガロースを使いたい場合、ゲルの作製は横型の方がはるかに楽である。今回は緩衝液としてHis-MESを使用した。他の緩衝液でも可能かもしれない。His-MES緩衝液は中性付近なので、タンパク質や核酸が変性する可能性が低い。

よって分子間相互作用も維持されと考えられ、高分子間相互作用、あるいは高分子と電荷を持つ低分子との相互作用を測定できる可能性がある。

文 献

- 1) Li, C. and Arakawa, T.: *Int. J. Biol. Macromol.*, **132**, 1290 (2019).
- 2) Goldenberg, D. P.: *In Protein Structure, A practical Approach, Second Edition* (Creighton, T. E., ed.), p. 187, IRL Press, Oxford (1997).