

Development of novel ampholyte for three-dimensional structural analysis in the free-flow isoelectric focusing

フリーフロー等電点電気泳動法における 3 次構造解析向けの
新規の両性電解質バッファの開発

Kim S.-H.¹, Miyatake H.¹, Ueno T.², Nagao T.² and Miki K.^{1,3}

金成勲¹, 宮武秀行¹, 上野朋行², 長尾卓也², 三木邦夫^{1,3}

(¹RIKEN Harima, ²TECAN JAPAN, ³Kyoto Univ.)

(¹理研播磨, ²Tecan Japan, ^{1,3}京大院・理)

e-mail: shkim@spring8.or.jp

X 線および NMR を用いた構造解析ではタンパク質の精製が大きなボトルネックとなっている。これらの構造解析では SDS-PAGE 的に単一、かつ等電点的にも単一の高純度の蛋白質が望ましい。これまでの精製は、カラムクロマトグラフィーを用いて SDS-PAGE で単一バンド程度の精製を行っている。カラムクロマトグラフィーではカラムごとに用いられるバッファの種類が異なるのが現状である。このバッファの交換は透析かまたはゲルろ過カラムを用いて行われている。しかし、透析などのバッファ交換は目的蛋白質の損失や時間がかかる短所がある。さらに、SDS-PAGE では単一であっても等電点的には単一とはいえない。

カラムクロマトグラフィーに対して等電点電気泳動法は、高い分離能を有するため分取より分析の分野で主に使われてきた。分取装置としてこれまで市販されている IsoprimeTM (Hoefer) はポリアクリルアミドゲルからなる等電膜を用いて pH 勾配を形成している。しかし、等電膜は目的蛋白質によって異なるためその作製は難しく、膜と目的蛋白質との分離が難しいことがしばしばある。これに対して、Tecan のフリーフロー電気泳動システム (ProTeamTM FFE) は、ポリアクリルアミドゲルなどのマトリクスを使わずに溶液中で分離を行うため高収率で目的物質を回収することができる特徴がある。

しかし、このシステムで pH 勾配を作るために用いられる両性電解質は Prolyte という付属のバッファである。このバッファは Hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) が含まれているために粘度があり、目的蛋白質との分離が困難なことから蛋白質の構造解析には向いてない。また、等電点電気泳動用の市販の他の会社の製品 (Ampholine : Immobiline (Amersham Pharmacia), BioLyte (Bio-Rad)) もその組成は知られておらず、蛋白質との分離が困難であり、目的蛋白質の活性を失うような有害なものが混ざっている可能性がある。このため、Tecan との共同研究でタンパク質精製・結晶化に適した新規な両性電解質バッファの開発を行った。この Prolyte に変わる結晶化向けのバッファは天然および合成の低分子量 (500 以下) の両性電解質を用いることで pH 勾配を作ることが可能である。

本研究では、新規な両性電解質を用いて pH 勾配に及ぼす流量および両性電解質の濃度の影響を調べた。流量が 78 mL/h の場合、泳動室の中は pH1.5 から 12.5 までのほぼ直線に近い pH 勾配を得ることができた。また、膜蛋白質の精製にも使えるように界面活性剤を用いて pH 勾配の形成を試みた結果、泳動室の中は pH1.5 から 13 までのほぼ直線に近い pH 勾配が得られた。