

市販リコンビナント蛋白の取り扱い注意

大島玲子^{#1} 牧(黒田)由紀子^{#1} 瀬尾めぐみ^{#1} 住友日香^{#1} 三ツ井貴夫^{#1}

#1 独立行政法人 国立病院機構 徳島病院 臨床研究部 776-8585 徳島県吉野川市鴨島町敷地1354番地

受付 2023.3.1 受理 2023.3.10 出版受託 2023.3.25

要旨

私は、研究捕手として日々の業務に取り組む中で、市販リコンビナント蛋白を購入し、無条件にその品質を信用して使用している。しかし、色々な機会にそれを使用するとうまくいかず、大変困ることがある。最近用いた O-GlcNAcase (OGA) もその1つで、市販リコンビナントの特性をつかむのに大変苦労した。今回はその苦労した経験について報告する。COS-1細胞をスライドガラス上で培養し、2種類の OGA を購入し、低濃度から高濃度で添加 (1~12units) し、反応時間も37℃で2時間~48時間と試し、抗 O-GlcNAc 抗体 (RL-2) とミトコンドリア抗体である抗 Tom20を用いて2重染色を行った。また OGA は凝集タンパクのため、Tween20やトレハロースを用いて OGA の溶解性が向上するよう図った。OGA R は高濃度を添加しても O-GlcNAc の染色性は全く変わらなかった。OGA L は購入後、劇的に効果を発揮し、O-GlcNAc の染色性が消失した。しかし急速に、効果が乏しくなり、何度染色してもコントロールと変化が認められなかった。そこで、分注保存している OGA が凝集した可能性が考えられたため、新たに OGA L を購入し、納付書どおりに溶解後、反応バッファーに1% Tween20を添加すると飛躍的に増強し、O-GlcNAc の染色性が消失した。一方、抗 Tom20抗体の染色性に差は認められなかった。凝集タンパクは扱いが難しく6時間もピペッティングを行っていたが、1% Tween20を添加することで溶解度が改善された。購入したリコンビナント蛋白を無条件で信用することなく、工夫することの大切さを感じた。

キーワード: OGA, リコンビナント蛋白

背景と目的

私は、研究助手として神経難病の一つであるパーキンソン病の分子メカニズムの解明について日々の業務に取り組んでおり、市販リコンビナント蛋白を購入し、無条件にその品質を信用して使用している。しかし、色々な機会にそれを使用するとうまくいかず、大変困ることがある。最近用いた O-GlcNAcase (OGA) もその1つで、市販リコンビナントの特性をつかむのに大変苦労した。今回はその苦労した経験について報告する。

材料および方法

カバーガラス上で培養した COS-1 細胞に、購入した2種類の OGA (R&D, Lectenz) を添加した。抗 O-GlcNAc 抗体 (RL-2, CTD110.6) とミトコンドリア抗体である抗 Tom20 を用いて2重染色を行った。¹⁾

結果

- ① R&D OGA は品質不良であった (図1) OGA はセリンとスレオニンの水酸基への N-アセチルグルコサミン (O-GlcNAc) を加水分解する酵素であるため、OGA 添加で O-GlcNAc の染色性は消失するはずだが、37℃ 24 時間反応させたが、染色性は弱くなったものの、完全に消すことができなかった。
- ② Lectenz OGA は効果があったが賞味期限が短かった (図2) Lectenz OGA を新たに購入し染色を行うと、OGA 処理で O-GlcNAc の染色性は消え成功したが、購入後しばらくすると、OGA の効果が無くなり、O-GlcNAc の染色性に変化が認められなかった。
- ③ Tween20 は新品 Lectenz OGA の賞味期限を若干伸ばすことができた (図3)

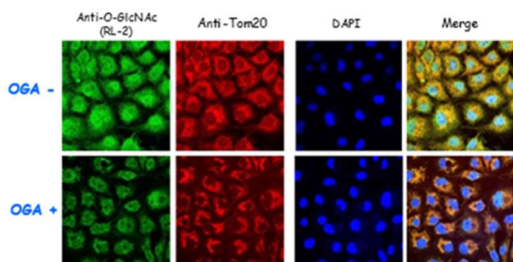
Correspondence to: 大島 玲子. 独立行政法人 国立病院機構 徳島病院 臨床研究部 776-8585 徳島県吉野川市鴨島町敷地1354番地 Phone: +81-88-324-2161 Fax: +81-88-324-8661 e-mail: oshima.reiko.jb@mail.hosp.go.jp

OGA 試薬は凝集性があるため、溶解性に問題があると考え、溶解性を向上させる試薬 (Tween20, トレハロース) などを添加した結果、新品の Lectenz OGA に 1% Tween20 を添加し、RT 28hr で反応させると O-GlcNAc の染色性は劇的に消えた。しかし溶解後、2weeks で効果は消失した。

結論

- ①はじめ、OGA (R&D ®) を購入したが、全く不良品であった。(OGA は凝集タンパクで変性しやすいらしい)
- ②やっと役に立つ商品 OGA (Lectenz ®) を購入したが、賞味期限が大変短かった。(一難去ってまた一難)
- ③市販されているリコンビナント蛋白は、平気で不良品が売られていることがあるので要注意である。

図 1 R&D OGA は品質不良であった

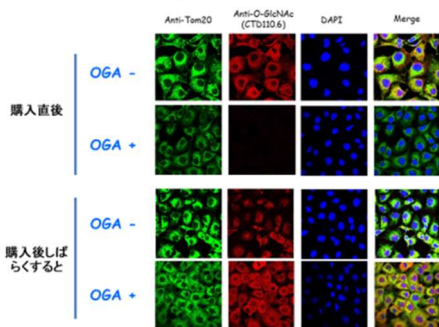


OGA はセリンとスレオニンの水酸基への N-アセチルグルコサミン (O-GlcNAc) を加水分解する酵素であるため、OGA 添加で O-GlcNAc の染色性は消失するはずだが、37℃ 24 時間反応させたが、染色性は弱くなったものの、完全に消すことができなかった。

文献

- 1) Kuroda Y, Mitsui T, Kunishige M, et al Parkin enhances mitochondrial biogenesis in proliferating cells. Hum Mol Genet, 2006;15: 883-895.

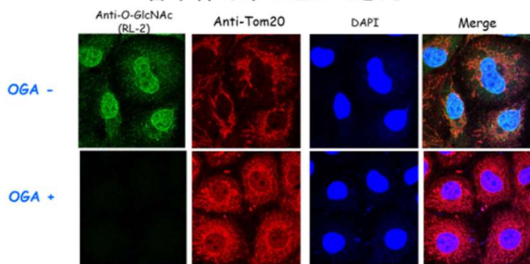
図 2 Lectenz OGA は効果があったが賞味期限が短かった



Lectenz OGA を新たに購入し染色を行うと、OGA 処理で O-GlcNAc の染色性は消え成功したが、購入後しばらくすると、OGA の効果がなくなり、O-GlcNAc の染色性に変化が認められなかった。

図 3

Tween20 は新品 Lectenz OGA の賞味期限を若干伸ばすことができた



OGA 試薬は凝集性があるため、溶解性に問題があると考え、溶解性を向上させる試薬 (Tween20, トレハロース) などを添加した結果、新品の Lectenz OGA に 1% Tween20 を添加し、RT 28hr で反応させると O-GlcNAc の染色性は劇的に消えた。しかし溶解後、2weeks で効果は消失した。