

リコンビナント蛋白のカスタムオーダー：へボ業者に要注意！

牧(黒田)由紀子^{#1} 住友日香^{#1} 瀬尾めぐみ^{#1} 大島玲子^{#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 2024. 3. 5 受理 2024. 3. 6 出版受託 2024. 3. 11

要旨

疾患の病態を解明する上で、リコンビナント蛋白を用いその機能を調べることは大変重要である。しかし、病院内の研究室で細胞の大量培養を行い、そこから蛋白精製を行うのは大変困難である。仕方なく市販品を購入するか、あるいは業者にカスタムオーダーすることになるが、どちらも大変高額であることが難点である。我々はカスタムオーダーしたリコンビナント蛋白で、想定外のトラブルが判明し、目の前が真っ暗になった辛い経験を報告する。

キーワード： O-GlcNAc 修飾、OGA、SCE-HCD MS/MS 解析

はじめに

Parkin は哺乳動物細胞内で O-GlcNAc による糖鎖修飾されているか否かを明らかにする。もしそうなら、Parkin のどのアミノ酸部位に O-GlcNAc が結合するか？

そのためには哺乳動物細胞で合成した大量の Parkin リコンビナント蛋白が必要である。しかし、その量を当研究室で精製することは技術的、予算的に非常に困難である。

そこで、リコンビナント蛋白の購入を検討した。

受注から届くまで

- ①哺乳動物由来パーキン蛋白 1mg 必要となり、国内、海外の業者を探した。
- ②品質、価格を考慮して米国 A 社を選定し、発注した。
- ③A 社は半額前払い制だったため、手付金として半額を支払った。
- ④しばらく連絡がなかったが、メールでなかなか精製できないとの連絡をうけた。
- ⑤その後、暫くして国際電話があり、哺乳動物細胞は難易度が高いため、昆虫細胞(Sf9)へ変更したいと連絡を受けた。しかし、以前、Sf9 由来 Parkin リコンビナント蛋白を購入し失敗した経験があるため、提案を断りあくまでも哺乳動物由来パーキン蛋白が必要と伝え、引き続き哺乳動物で進めることになった。

Correspondence to: 牧(黒田) 由紀子. 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: maki.yukiko.yd@mail.hosp.go.jp

⑥その後、まったく音沙汰がなく半額も支払っているため大変不安だったが、約 1 年後に先方からようやくできたとの吉報が届き、大喜びした。

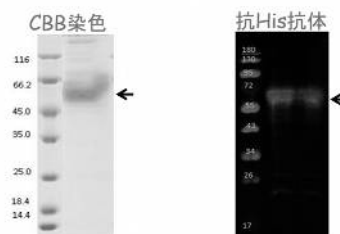
⑦手元に届き、残金を支払った。

結果

- ①届いたリコンビナントパーキン蛋白 (図 1) 届いた HEK293 由来 Parkin リコンビナント蛋白は、シャープなバンドではないことが懸念されたが、CBB 染色で目的の高さにシングルバンドが検出され、タグの抗 His 抗体でも染色されたものが納品された。

図 1

届いたリコンビナントパーキン蛋白



届いたHEK293由来Parkinリコンビナント蛋白は、CBB染色で目的の高さにシングルバンドが検出され、タグの抗His抗体でも染色されたものが納品された。

シャープなバンドではないことが少し気にはなったけど・・・

②当研究室で品質チェック (図 2)

当研究室においても納品された蛋白の品質チェックを行った。CBB 染色で検出されたバンドは抗 His 抗体、抗パーキン抗体 (PRK8) で目的の高さに、少し薄いけどバンドが検出された。次に Click-iT による O-GlcNAc 修飾の検出と OGA による O-GlcNAc 修飾の除去のチェックを行った。¹⁾

図 2

当研究室で品質チェック



③O-GlcNAc 修飾付加チェック (図 3)

抗 Parkin 抗体 Par6 はレーン 1, 2 とともに反応したが、レーン 2 は少し薄かった。

抗 TAMRA 抗体はレーンに 2 (高額 Parkin) のみに反応し、この Parkin が O-GlcNAc 修飾されていることが示唆された。

図 3

O-GlcNAc修飾付加チェック



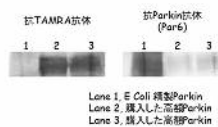
抗Parkin抗体Par6はレーン1,2ともに反応したが、レーン2は少し薄かった。抗TAMRA抗体はレーンに2(高額Parkin)のみに反応し、このParkinがO-GlcNAc修飾されていることが示唆された。

④OGA (O-GlcNAcase) 処理 (図 4)

OGA 処理したレーン 3 では、Parkin の O-GlcNAc 修飾は除去されるはずであったが、OGA 処理していないレーン 2 と同様に抗 TAMRA 抗体に反応した。また、不思議なことにレーン 2, 3 とともに抗 Parkin 抗体に反応しなくなった。何回も実験を繰り返すうちに、とうとう蛋白 1mg を使い果たし、再

図 4

OGA(O-GlcNAcase)処理



OGA処理したレーン3では、ParkinのO-GlcNAc修飾は除去されるはずであったが、OGA処理していないレーン2と同様に抗TAMRA抗体に反応した。また、不思議なことにレーン2,3ともに抗Parkin抗体に反応しなくなった。

実験を繰り返すうちに、とうとう蛋白1mgを使い果たし、再度注文した。

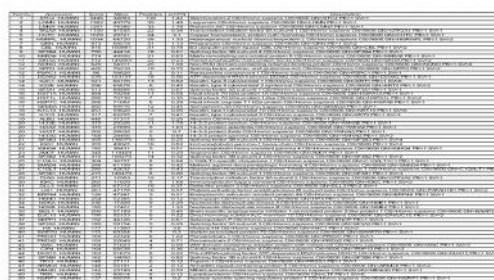
度注文した。しかし何度行っても Parkin は哺乳動物細胞内で O-GlcNAc 修飾されていることを完全には証明できなかった。

⑤SCE-HCD MS/MS 解析 (図 5)

O-GlcNAc 修飾部位を同定するため、SCE-HCD MS/MS 解析を行った。200 種類以上のペプチド断片がヒットしたが、その中に Parkin 断片は痕跡ほども検出されなかった。何かの間違いだらうと思い、2 回実施したが、同様の結果であった。言うまでもなく、目の前が真っ暗になった。

図 5

SCE-HCD MS/MS解析



O-GlcNAc修飾部位を同定するため、SCE-HCD MS/MS解析を行った。200種類以上のペプチド断片がヒットしたが、その中にParkin断片は痕跡ほども検出されなかった。何かの間違いだらうと思い、2回実施したが、同様の結果であった。言うまでもなく、目の前が真っ暗になった。

まとめ

- ①哺乳動物細胞発現系における Parkin リコンビナント蛋白の精製は当研究室では収量が少なく、大変高額ではあるが泣く泣く業者 (USA) へ 1mg オーダーした。
- ②届いたタンパクを用いた研究は失敗を重ねるうちに 1mg を使い果たしてしまい、おかわりで再度 1mg を購入した。
- ③sce-HCD 解析により糖鎖修飾部位の同定を行ったところ、そのタンパクの品質に重大な問題があることが判明した。大金をはたいて購入した蛋白は N 端に 5xHis タグを有し、Parkin と同じ分子量ではあるが、アミノ酸配列は Parkin とは似ても似つかぬ正体不明の代物だった。

考察

- ①そもそも、専門業者に発注し、購入した試料の品質には何の疑いも持たないことが普通である。しかし、我々が入手した蛋白は本来のものとは全く別物であったことが判明するのに、何と 3 年以上かかってしまった。
- ②専門を自称する委託業者を安易に信用してはならぬという痛恨の教訓を得た。

引用文献

- 1) David J Vocadlo, Howard C Hang, Eun-Ju Kim,, et al A chemical approach for identifying O-GlcNAc-modified proteins in cells. PNAS, 2003;100 (16):9116-21.