

Native-PAGE による蛋白のオリゴマー化の検出

瀬尾 めぐみ^{#1} 牧(黒田) 由紀子^{#1} 住友 日香^{#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 とくしま医療センター西病院 臨床研究部 776-8585 徳島県吉野川市鴨島町敷地 1354 番地

受付 2025. 3. 6 受理 2025. 3. 7 出版受託 2025. 3. 10

要旨

私達はパーキンソン病をはじめとした神経変性疾患の分子病態の解明にリコンビナント蛋白を使用している。しかしながら、せっかく精製したその蛋白が native な状態にあるのか、あるいはミスフォールドによりオリゴマー化しているのかを判別することは容易ではない。私達はオリゴマー化の有無を検出するため、Native-PAGE (polyacrylamide gel electrophoresis) を試みた。対象は中国 N 社へ発注した H2B 蛋白の2回分と NEB 社で購入した市販 H2B 蛋白を使用し Ponceau S、および ATTO のキットを使用し BN-PAGE を行った。また BN-PAGE 改良版の Clear Native PAGE も試みた。Ponseau S を使用した方法は全くうまくいかなかった。キットを使用すると泳動はでき、市販の蛋白ならびに2回目のカスタムオーダーの蛋白はオリゴマー形成が認められた。BN-PAGE 技術を試行錯誤ののち習得することができた。今後も新たな技術に挑戦していきたい。

キーワード : Native-PAGE、オリゴマー

背景と目的

私達と取り組んでいる神経変性疾患の分子病態の研究には、大腸菌発現系により産生・精製されたリコンビナント蛋白が必要となる。しかし、リコンビナント蛋白の in-house の作製には多くの手間と時間がかかり、技術的に困難なことも多いため、非常に高価ではあるが市販品や受託合成を利用することが多い。通常リコンビナント蛋白の品質は SDS-PAGE でチェックされ、これまで私達はそれを信じて多くの製品を購入してきた。私達の研究には native な状態の蛋白が必要であるが、購入タンパクにはミスフォールドした状態のものが少なくないことが判明した。蛋白のミスフォールドは SDS-PAGE では検出できず、Native PAGE が必要となる。蛋白のミスフォールドは SDS-PAGE では検出できず、Native PAGE が必要となる。そこで、私達がこれまでに実施した2種類の Native PAGE について報告する。

対象と方法

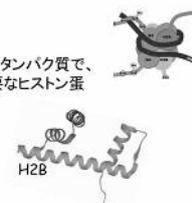
ヒストン H2B 蛋白は、126 アミノ酸からなる低分子タンパク質で、真核細胞でクロ

マチン構造に関与する 4 つの主要なヒストン蛋白質 (H2A、H2B、H3、H4) のうちのひとつで、私達はヒストン H2B 蛋白を計3回購入した。これら H2B 蛋白の品質を native-PAGE で検討した。(図1)

図1

ヒストンH2B

ヒストンH2B蛋白は、126アミノ酸からなる低分子タンパク質で、真核細胞でクロマチン構造に関与する4つの主要なヒストン蛋白(H2A、H2B、H3、H4)のうちの一つ



私達はヒストンH2B蛋白を計3回購入した。

- | | |
|-----|-------------|
| 1回目 | A社受託合成(1回目) |
| 2回目 | B社市販品 |
| 3回目 | A社受託合成(2回目) |

これらH2B蛋白の品質をnative-PAGEで検討した。

中国 N 社で H2B 蛋白を 2 回発注した。また市販の NEB 社 H2B 蛋白を購入し、Ponceau S、および ATTO のキットを使用し BN-PAGE を行った¹⁾。3 サンプルとも SDS を含まないサンプル buffer を加え Ponceau S 含トリス緩衝液およびトリス緩

Correspondence to: 瀬尾 めぐみ, 独立行政法人 国立病院機構 とくしま医療センター西病院 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: seo.megumi.ey@mail.hosp.go.jp

衝液にて 150V 低電圧で 3 時間泳動した。泳動後の脱色液は、50%メタノール、10%酢酸を使用した。また BN-PAGE 改良版の Clear Native PAGE (CN-PAGE) も試みた。

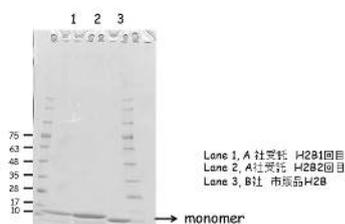
結果

H2B 蛋白の品質チェック

図 2 に示すように、A 社で受託した H2B 蛋白 1 回目、2 回目、B 社で購入した市販品 H2B 蛋白 3 つとも約 15KDa の 1 本のバンドが検出された。このことより、この時点では単量体と推測できた。

図 2

H2B蛋白のSDS-PAGE



レーン1,2,3ともに約15KDaの1本のバンドが検出された。

Ponceau S を用いた BN-PAGE 法

図 3 に示したとおりの方法で泳動を行ってみたが、ここで問題が発生した。サンプルがゲルを 1/3 挿入した段階で陰極 Buffer を入れ替えないといけないが、サンプルが赤色、泳動 Buffer は、濃い青色でサンプルがゲルに侵入したのが分からなかった。そこで、この方法は撤退した。

図 3

Ponceau S を用いたBN-PAGE法

1. サンプル Buffer
Ponceau S入りサンプルBuffer: 赤色
2. 泳動buffer
陰極Buffer、陽極Bufferをそれぞれ使用
3. 特徴
サンプルがゲルに侵入→定電流15mAに変更
サンプルがゲルを1/3進む→陰極Buffer入れ替え

ここで問題が発生

サンプルは赤、Bufferは濃い青でサンプルがゲルに侵入したのが分からなかった。

➡ Ponceau S 撤退

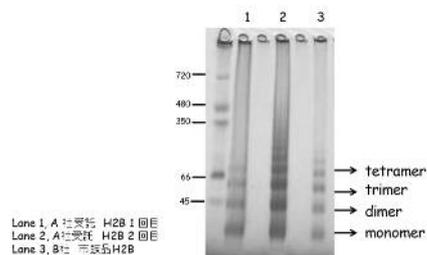
BN-PAGE

ATTO のキットを用いて、BN-PAGE を行った。その結果、レーン 2 の A 社に受託した 2 回目 H2B 蛋白とレーン 3 の市販品 H2B 蛋白

はオリゴマー形成が認められたが、レーン 1 の 1 回目に受託した H2B 蛋白は明らかな形成が認められなかった。(図 4)

図 4

BN-PAGE



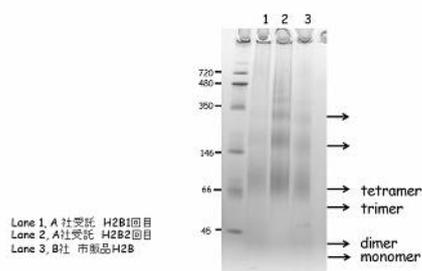
レーン2のA社に受託した2回目H2B蛋白とレーン3の市販品H2B蛋白はオリゴマー形成が認められたが、レーン1の1回目に受託したH2B蛋白は明らかな形成が認められなかった。

CN-PAGE

レーン 2 の A 社に受託した 2 回目 H2B 蛋白は、オリゴマー形成が認められた。一方、レーン 1 の 1 回目に受託した H2B 蛋白とレーン 3 の市販 H2B 蛋白は明らかな形成が認められなかった。(図 5)

図 5

CN-PAGE 結果



レーン2のA社に受託した2回目H2B蛋白は、オリゴマー形成が認められた。一方、レーン1の1回目に受託したH2B蛋白とレーン3の市販H2B蛋白は明らかな形成が認められなかった。

まとめ

- ① 3 サンプルの H2B 蛋白を BN-PAGE および CN-PAGE を行った。
- ② SDS-PAGE では 3 サンプルとも 1 本のバンドであったが、Native PAGE を行うと、2 サンプルはオリゴマー形成が著明であった。
- ③ 国内では sec-HPLC を受託する業者がほとんどなく、BN-PAGE 技術の取得を試み、試行錯誤ののち習得することができた。
- ④ 何の疑いもなくリコンビナントタンパクを購入し使用しているが、市販品といえ

ども品質を妄信してはいけないことが判明した。

引用文献

- 1) 田村 茂彦 BN-PAGE によるタンパク質複合体の解析 (改訂). 蛋白質科学会アーカイブ, 1, e015 (2008).