

令和 6 年 6 月 23 日現在

機関番号：35408

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2023

課題番号：19K05704

研究課題名(和文) 正電荷に基づくタンパク複合体電気泳動Reverse Native PAGEの開発

研究課題名(英文) Positive charge-based electrophoresis for protein complexes

研究代表者

平野 真 (Hirano, Makoto)

安田女子大学・薬学部・講師

研究者番号：60514172

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、正電荷を含むタンパク質複合体を電気泳動により分離するため、新たな電気泳動法の開発を行った。タンパク質複合体に正電荷を付与するチャージシフト分子として、パラロースアニリンを出発物質に、その誘導体を合成した。これらが中性の溶液で正に帯電することを示した。これらを用いて、種々の組織由来のタンパク質複合体に正電荷を付与し、電極を逆転させ、電気泳動することができた。また、糖鎖認識分子であるレクチンと糖タンパク質の複合体のような比較的弱い相互作用により形成された複合体にも適用できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

タンパク質複合体の分離にはゲル濾過も用いられるが、電気泳動の方が分離能は圧倒的に高い。また、複合体の大きさに応じて適切なゲル濾過担体を選択する必要があるが、電気泳動では濃度勾配ゲルを用意すれば幅広い大きさの複合体に対応できる。電気泳動によるタンパク質複合体の分離にはNative PAGEやBlue Native PAGEなどが適用されている。しかし、いずれもタンパク質複合体の負電荷に基づき分離する。本研究にて開発したRN-PAGEでは正電荷に基づき分離する。本法により、これまで困難であった陽イオンを含むタンパク質複合体の分離が可能となり、これまでの負電荷に基づく分離と相補的な手法となり得る。

研究成果の概要(英文)：In this study, we developed a novel electrophoretic method to natively separate protein complexes containing positive charge such as Ca²⁺ and Mg²⁺ ions. Pararosaniline derivatives were synthesized as charge shift molecules. These derivatives were positively charged in a neutral solution. Some of the derivatives could bind to protein complexes derived from several animal tissues. The protein complexes could be electrophoresed by the proposed method. In addition to this, the method could be applied to an electrophoresis of complex composed of a lectin (glycan-recognizing protein) and a glycoprotein.

研究分野：生化学

キーワード：電気泳動 陽イオン

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生体内において、酵素など、多くのタンパク質は他のタンパク質などと複合体を形成し機能を発揮する。そのため、タンパク質複合体の形成状態は、対象とするタンパク質の生物機能を議論する上で不可欠な情報である。

タンパク質複合体の解析には、Native polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) などの電気泳動の技術が適用されてきた。既存のタンパク質電気泳動では、もともと負に帯電したタンパク質、あるいは、タンパク質を負に帯電させて陽極側にゲル中を走行させ、タンパク質(複合体)を分子サイズに応じて分離する。これと二次元電気泳動や質量分析によるプロテオミクス解析などを組み合わせ、数多くのタンパク質複合体が解析されてきた。

しかしながら、タンパク質が複合体を形成するためには、糖認識分子であるレクチンと糖鎖との相互作用など、 Ca^{2+} や Mg^{2+} などの金属イオンが必須な場合がある。このように金属イオンが多く含まれるタンパク質複合体の場合、タンパク質複合体の正味の電荷で泳動する Native PAGE で分離しようとする、複合体は陰極側に引き寄せられゲルに入れにくい。等電点電気泳動も候補に挙げられるが、クリアに分離するためには、アセトン沈殿などで塩類を除く必要があり、陽イオンが除去されるだけでなく、タンパク質も変性し複合体は崩壊する。また、タンパク質複合体に CBB G250 という負電荷を帯びた色素を付着させ、複合体を分離する Blue Native PAGE がある。これは、Native PAGE で不可能であった正味正電荷を帯びたタンパク質複合体の泳動を可能にした画期的な手法である。しかし、Blue Native PAGE の前処理として、タンパク質サンプルと 2 価の陽イオンのキレート剤である EDTA を混和させる必要がある (EDTA を除くと分離能が著しく低下した)。そのため、泳動する前に 2 価の陽イオンが必要なタンパク質複合体は崩壊する。

以上の理由から、既存の電気泳動法では金属イオン要求性のタンパク質複合体を分離するのは困難である。それ故、現状、プロテオミクス解析において金属イオン要求性のタンパク質複合体が見逃されている。

2. 研究の目的

以上の背景から、本研究では、生体試料から正電荷に基づいてタンパク質複合体を分離可能な電気泳動法 Reverse Native PAGE (RN-PAGE) を開発し、これまで見逃されてきた金属イオン要求性タンパク質複合体の解析に寄与することを目的とした。

3. 研究の方法

はじめに、電極を逆転させる電気泳動が可能か否か検証した後、タンパク質複合体に正電荷を付与可能な色素化合物を探索、合成し、それらの物性を調べ、RN-PAGE に使用可能な化合物を絞り込み、臓器由来のタンパク質複合体等を RN-PAGE で泳動可能か検証することとした。

4. 研究成果

(1) 電極を逆転させた電気泳動

根本的に電極を逆転させるコンセプトの是非を問うため、陰イオン性界面活性剤 Sodium dodecylsulfate をタンパク質に結合させ負電荷を付与して泳動する SDS-PAGE をヒントに、タンパク質に陽イオン性界面活性剤で正電荷を付与し電気泳動を試みた。このとき、還元処理した卵白アルブミンと未処理の卵白アルブミンをサンプルとしたが、還元、非還元の卵白アルブミンの

粒子としての大きさを見分けられた。すなわち、SDS-PAGE と同レベルでの泳動に成功した。よって、正電荷を付与する化合物を適切に選択できれば、電極を逆転させた RN-PAGE による複合体の分離が可能と示された。

(2) 既存色素化合物とタンパク質との相互作用

Blue Native PAGE では、タンパク質複合体に負電荷を付与するのに CBB G250 が用いられる。そこで、タンパク質複合体に正電荷を付与可能な既存の色素化合物を見出すため、タンパク質と十数種の色素化合物との相互作用を検証した。しかしながら、CBB G250 ほどの結合能を示す化合物は見出せなかった。

(3) CBB-G250 の改変

そこで、CBB G250 のスルホン基を脱離、もしくは、スルホンアミド化し、正電荷を付与可能な化合物に改変できないか試みた。過酷な条件でもベンゼンスルホン化の逆反応によるスルホン基の脱離は進行しなかった。また、スルホンアミド化では、CBB G250 のナトリウム塩を塩化チオニルで処理し、スルホン基を塩素化後、アンモニアによりスルホンアミド化する工程を試みたが、塩素化が進行しなかった。そのため、CBB G250 を出発物質にして目的化合物を得るのは困難と判断した。

(4) CBB-G250 類似化合物の作製

そのため、小さな化合物を出発化合物として、CBB G250 に類似した骨格をクリックケミストリーにより組み立て、側鎖に正電荷を付与するルートで候補化合物を合成することにした。出来上がった化合物群は、水溶性に乏しかったものの、蛍光を発する性質を持つため、電気泳動の際、ゲル中でタンパク質を検出するのに有効である。

(5) パラローズアニリン誘導体の合成

上記化合物群は、水溶性に乏しく扱いが難しく、汎用性に欠けるため、CBB G250 の中心骨格を担うパラローズアニリンから還元アミノ化反応等で側鎖を伸長し、複数の新規色素化合物を合成した。これらの色素化合物では水溶性を向上させることができ、近赤外領域の蛍光を発する性質を持つ化合物であった。

(6) 合成化合物の荷電状況

合成したパラローズアニリン誘導体の中性付近での荷電状況を検証するため、濾紙電気泳動を行った。いずれの化合物も陰極側への移動が観察されたことから、いずれも中性で正電荷を帯びていることが明らかになった。

(7) 生体由来のタンパク質の RN-PAGE

実際に、RN-PAGE でタンパク質複合体のチャージシフト分子になり得るか検証するため、マウス肝臓やイモリの種々の臓器から得た非イオン性界面活性剤抽出物と混和し、RN-PAGE を行ったところ、3種類の化合物でタンパク質複合体を電気泳動できた。

(8) レクチンと糖タンパク質の複合体の RN-PAGE

レクチンと糖鎖の相互作用は比較的弱い相互作用に分類される。このような弱い相互作用により形成された複合体の電気泳動にも適用可能か検証するため、Ca²⁺依存的にハイマンノース糖鎖を認識するレクチンである BC2L-A とハイマンノース糖鎖を有することが知られる卵白アルブミンとの組み合わせをモデル複合体として RN-PAGE を実施した。複合体を泳動したレーンでは、レクチンを含まないオボアルブミン単独のレーンに比べて、バンドが上方に検出されたため、比較的弱い相互作用によって形成された複合体でも泳動できることが示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 平野笑夢、平野真
2. 発表標題 イペリアトゲイモリの心臓再生に関わる糖鎖複合体に関する研究
3. 学会等名 第42回日本糖質学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 平野笑夢、平野真
2. 発表標題 イペリアトゲイモリの心臓再生における糖鎖の関与
3. 学会等名 第62回 日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会 中国四国支部学術大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 平野 笑夢、佐伯 嘉乃、平野 真
2. 発表標題 イモリの効率的な組織再生に寄与する糖鎖複合体の探索
3. 学会等名 第92回日本体力医学会中国・四国地方会
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------