

【原著】

SDS- ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) における SDS が与えるリン酸化タンパク質の相対移動度への影響

木下 英司¹, 面出 鈴音¹, 加藤 舞¹, 塩田ゆきの¹, 西田 りん¹,
矢田明日香¹, 山田梨緒菜¹, 木下恵美子²

¹広島文教大学人間科学部人間栄養学科

²広島大学大学院医系科学研究科医薬分子機能科学研究室

Effect of SDS on migration index of phosphorylated proteins in
SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

Eiji Kinoshita¹, Suzune Omode¹, Mai Kato¹, Yukino Shiota¹, Rin Nishida¹,
Asuka Yata¹, Riona Yamada¹, Emiko Kinoshita-Kikuta²

¹Department of Human Nutrition, Faculty of Human Sciences, Hiroshima Bunkyo University

²Department of Functional Molecular Science, Graduate School of Biomedical and Health Sciences, Hiroshima University

Abstract

A variety of protein-targeted studies are being conducted to gain a fundamental understanding of living systems and to elucidate the mechanisms of disease pathogenesis. In such life science research fields, SDS-PAGE is widely used for protein separation and analysis. In this study, several proteins were analyzed by SDS-PAGE to better understand the characteristics and properties of the relationship between the molecular weight and electrophoretic migration index of proteins under various conditions. We also investigated the effect of SDS on the migration index of phosphorylated proteins, focusing on the phenomenon that the migration rate of phosphorylated proteins in SDS-PAGE is slower than that of dephosphorylated counterparts. The results revealed that the relative mobility of proteins is affected by the concentrations of the resolving gel matrix and cross-linking agent and may be also significantly affected by the addition of phosphate groups, one of the post-translational modifications. We thus concluded that it is necessary to examine the proteins under various SDS-PAGE conditions, paying close attention to these points, depending on the protein to be analyzed. Furthermore, the effect of SDS on the migration index was examined by changing the concentration of SDS in the electrophoresis sample buffer and the running buffer. The results showed that electrophoresis was inhibited to a greater extent at lower SDS concentrations in both buffers, and the relative mobility of the phosphorylated proteins was significantly smaller, but the correlation with molecular weight was also greatly disturbed. Finally, it was concluded that the influence of SDS on SDS-PAGE is enormous, and that it is extremely difficult to find the cause of the small migration index of phosphorylated proteins in SDS-PAGE by varying the concentration of SDS in the electrophoresis sample buffer and the running buffer.

1. 序 論

電気泳動とは、ある溶液に一对の電極（陽極と陰極）を入れて直流電流を流したとき、溶液中の荷電粒子が自分のもつ電荷と反対の極に向かって移動する現象のことである¹⁻⁴。この現象を利用することで、電荷や分子量、形状の異なる核酸やタンパク質等の生体分子を分離・濃縮・分取できるため、電気泳動は分子生物学や生化学を中心とした生命科学の研究領域において、それらの生体分子を分離分析する手法として広く用いられている⁵⁻⁸。

本研究では、タンパク質の分離分析やその分子量測定などで汎用されるLaemmli法⁹に基づいたドデシル硫酸ナトリウム (SDS) -ポリアクリルアミド電気泳動 (Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis: SDS-PAGE) を用いてタンパク質の電気泳動実験を行った。SDS-PAGEとは、目的タンパク質の高次構造を変性させ、分子量の違いにより分離する電気泳動法である^{10,11}。タンパク質試料を陰イオン性の界面活性剤であるSDSを用いて処理すると、SDSの疎水基（ドデシル基： $C_{12}H_{25}$ ）がタンパク質の表層内部に相互作用し、タンパク質表面にSDSの親水基（硫酸基： $-OSO_3^-$ ）が位置することでタンパク質分子を負電荷にさせる。この際に、2-メルカプトエタノールなどの還元剤によりタンパク質のジスルフィド結合（S-S結合）を切断しその高次構造を変性させることで、分子全体をほぼ均一に負に帯電させた状態にすることができる。このように前処理したタンパク質試料を電気泳動すると、タンパク質の形や性質に関わらず分子量にしたがって分離することができる。タンパク質試料を供したポリアクリルアミドゲルに直流電流を印加すると、負に荷電したタンパク質はすべて、陽極（正の電極）に向かってゲル中を移動する。ゲルマトリックスの分子篩効果によって、低分子量のタンパク質は高分子量のタンパク質よりも速くゲルの中を泳動できる。分子篩効果とは、ゲルマトリックスの有効孔径に応じて大きい分子と小さい分子とが篩い分けられる効果であり、この効果を利用して分子量の異なる様々なタンパク質分子を分離することが可能となる。

同一ゲルにてタンパク質試料とともに分子量マーカー（M.W.マーカー）を電気泳動することで、M.W.マーカー中の既知分子量のタンパク質から試料に含まれるタンパク質の分子量が測定できる¹¹⁻¹³。電気泳動による分離後、Coomassie Brilliant Blue R-250 (CBB) 等の色素を用いてゲル染色を行うことで、タンパク質を泳動バンドとして視覚化させそれぞれの相対移動度（Rf値：relative to front）を求めることが可能となる¹⁴⁻¹⁶。また、タンパク質にリン酸基が付加したリン酸化タンパク質の中には、リン酸基を取り除いた同じタンパク質（脱リン酸化タンパク質）よりも電気泳動の移動速度が有意に遅くなる現象がしばしば観察される^{17,18}。このため分子量がほぼ同一である両者にもかかわらず（リン酸基の分子量は80 Da¹⁹）、Rf値の異なる泳動バンドとしてそれぞれを可視化でき、Rf値の差に基づいてタンパク質の翻訳後修飾の1つであるリン酸化の有無を評価できる場合がある。

本研究において、我々は、数種のタンパク質をSDS-PAGEにより解析し、様々な条件下におけるタンパク質の分子量と相対移動度の関係について、その特徴や性質の理解を深めることを目的として実験を行った。その中で、SDS-PAGEにおけるリン酸化タンパク質の移動速度が脱リン酸化タンパク質の移動速度よりも遅くなる現象に注目した。このような現象が観察される一因として、リン酸基の2価の負電荷（ $-OPO_3^{2-}$ ）がタンパク質と陰イオン系界面活性剤であるSDSとの疎水性相互作用（以下、結合と記す）を阻害して電気泳動を抑制しているのではないかと考え、SDSがリン酸化タンパク質の相対移動度に与える影響について、SDS-PAGEで使用するサンプルバッファーや泳動バッファーに含まれるSDSの濃度を変えながら検討を行った。

2. 実験材料と方法

2.1. 材料と装置

牛血清アルブミン (BSA), 牛乳 α -カゼイン, 牛乳 β -カゼイン, 及び鶏卵白アルブミン (OVA) はシグマ社より, 仔牛小腸由来アルカリホスファターゼ (ALP, 20U/ μ L) はロッシュ社より, M.W.マーカーはタカラバイオ社より, Tris, HCl, SDS, 2-メルカプトエタノール, グリセロール, プロモフェノールブルー (BPB), 塩化マグネシウム, TEMED, 過硫酸アンモニウム, アクリルアミド, *N,N'*-メチレンビスアクリルアミド (BIS), グリシン, CBB, メタノール, 及び酢酸は富士フィルム和光純薬社より, 注射器及び注射針 (27G) はテルモ社より, それぞれ購入した。電気泳動装置はアトー社製のラピダスミニスラブAE-6530モデルを, 直流電源装置はアトー社製のマイパワー II 300 AE-8135を, ゲル撮影装置はアムズシステムサイエンス社製のHA1310型白色光落射/透過兼用ライトビューアー付きLimited-Stage-SBモデルを, それぞれ使用した。

2.2. SDS-PAGE用タンパク質の調整

タンパク質試料の調整には, 195mM Tris-HCl (pH 6.8), 3.0% (w/v) SDS, 15% (v/v) 2-メルカプトエタノール, 30% (v/v) グリセロール, 0.1% (w/v) BPBを含むSDS-PAGE用サンプルバッファー (3 \times) を用いた。このSDS-PAGE用サンプルバッファーを各タンパク質試料溶液に1/2容量加え, SDS-PAGEを行う前に, 100 $^{\circ}$ C, 5分間の熱処理を行った。必要に応じて, SDSの最終濃度が1.0% (w/v), 0.3% (w/v), 0% (w/v) になるようにSDS-PAGE用サンプルバッファー (3 \times) を調整した。

2.3. ALPを用いた脱リン酸化反応

ALPを用いた脱リン酸化反応は以前の我々の報告にしたがって行った^{20, 21}。即ち, 10mg/mLタンパク質25 μ L溶液に, 10 \times ALPバッファー3 μ L, ALP (20U/ μ L, 購入したものを希釈せずに原液で使用し, 4 $^{\circ}$ Cで保存, 操作はすべて氷上で実施) 1 μ L, 及びイオン交換水1 μ Lを加え, 総量30 μ Lの反応溶液を37 $^{\circ}$ Cのブロックヒーターで5時間保温した。ただし, ALP処理なしの反応溶液には, ALPの代わりにイオン交換水1 μ Lを加えた。5時間保温しALPを反応させた後, 15 μ LのSDS-PAGE用サンプルバッファー (3 \times) を加えることで反応を停止した。この溶液は5.56mg/mLタンパク質濃度となっているため, SDS-PAGE解析用として1 \times SDS-PAGE用サンプルバッファーを205 μ L加えてタンパク質濃度を1.0mg/mLになるようにしてSDS-PAGEの実施直前まで-20 $^{\circ}$ Cで保存した。なお, 10 \times ALPバッファーの組成は, 10mM塩化マグネシウムを含む500mM Tris-HCl (pH 9.0) である。

2.4. SDS-PAGE

ゲルの支持体としてポリアクリルアミドを用い, 分離層 (分離ゲル) と濃縮層 (濃縮ゲル) からなる不連続緩衝液系ゲル (分離ゲルと濃縮ゲルでpHの異なるゲル) を作成した。分離ゲル (6.3mL) の組成は, アクリルアミド総濃度7.5 ~ 15% T (w/v) 及びBIS濃度2.6 ~ 5.4% C (w/v) (アクリルアミドとBISの比は17.5:1, 29:1, 37.5:1の3通り), 375 mM Tris-HCl (pH 8.8), 0.1% (w/v) SDSとした。濃縮ゲル (1.8mL) の組成は, アクリルアミド総濃度4% T (w/v) 及びBIS濃度3.3% C (w/v) (アクリルアミドとBISの比は29:1), 125mM Tris-HCl (pH 6.8), 0.1% (w/v) SDSとした。いずれのゲルもTEMEDと過硫酸アンモニウムを用いて重合させた。SDS-PAGE用

泳動バッファーは、25mM Tris, 192mM グリシン, 0.1% (w/v) SDSを使用した。通電は、ゲル1枚あたり電圧250V, 電流20mAで70～90分間行った。タンパク質バンドの検出は、0.25% (w/v) CBB, 40% (v/v) メタノール, 10% (w/v) 酢酸を含むCBB染色液と、10% (v/v) メタノール, 10% (w/v) 酢酸を含むCBB脱色液を用いた。ラピダスミニスラブAE-6530モデルを使用したSDS-PAGEの手順を以下に列記する。

- ① 使用したい濃度の分離ゲル溶液を組み立てた泳動用ガラス板間の1mm間隙に注いだ後、イオン交換水を分離ゲル溶液の上方に重層して30分間室温で放置して重合させる。
- ② 分離ゲルに重層したイオン交換水を捨て、濃縮ゲル溶液を分離ゲルの上方に注いだ後、試料溝の鋳型となるコームを装着して30分間室温で放置して重合させる。
- ③ 適量のSDS-PAGE用泳動バッファーを注ぎながら、試料溝の鋳型に用いたコームを濃縮ゲルからゆっくり穏やかに取り外す。
- ④ ガラス板を泳動装置にセットした後、必要な箇所にSDS-PAGE用泳動バッファーを注ぐ。
- ⑤ 注射器（注射針は27G）を用いて濃縮ゲルに作られた試料溝の中を洗浄し（重合しなかったアクリルアミド等のデブリを取り除く）、試料溝の形を整える。
- ⑥ 向かって左の試料溝からM.W.マーカーとタンパク質試料を順次注入する。
- ⑦ +電極用と-電極用の2本の電源ケーブルのついた蓋を泳動装置に取り付ける。
- ⑧ 泳動装置の2本の電源ケーブルを直流電源装置に繋ぐ。
- ⑨ ゲル1枚当たり電圧250V, 電流20mA（ゲル2枚で電気泳動する場合は電圧250V, 電流40mA）で試料中のBPBの青色バンドが分離ゲル下端に到達するまで泳動する。
- ⑩ 電源を切った後、2本の電源ケーブルを直流電源装置から外す。
- ⑪ 泳動装置からガラス板を取り出す。
- ⑫ ヘラを使ってゲル上部の濃縮ゲルを取り除き、CBB脱色液を入れたタッパー容器に分離ゲルを静かに入れる（分離ゲルを傷つけように細心の注意を払う）。
- ⑬ 震とう器を使い、穏やかに30分間室温で震とうする。
- ⑭ CBB脱色液を捨てた後（その脱色液は再利用のため室温保存）、CBB染色液を注ぎ入れ、震とう器を使い、穏やかに30分間室温で震とうして、CBB染色液をゲルに十分に染み込ませる。
- ⑮ CBB染色液を捨て、使用済みCBB脱色液を再利用してゲルを洗浄する。
- ⑯ CBB脱色液を捨てた後、新たに未使用のCBB脱色液を注ぎ入れ、翌日まで室温で震とうする。
- ⑰十分にゲルが脱色されたことを確認した後、ゲルを撮影する。ゲルの脱色が不十分な時や脱色ムラができていた時は、適宜メタノールを用い処置を行う。

3. 実験結果

3.1. 分離ゲルの支持体濃度 (%T) と架橋剤濃度 (%C) について

本実験では、牛血清アルブミン (BSA), 牛乳 α -カゼイン, 牛乳 β -カゼイン, 鶏卵白アルブミン (OVA) の4種類 (ALP: -) とそれらをALP処理したもの (ALP: +) をタンパク質試料として調整し、M.W.マーカーと共にSDS-PAGEを行った。支持体であるポリアクリルアミドの濃度 (%T) は10% (分離ゲル濃度) で統一し、架橋剤であるBISの濃度 (%C) は2.6%, 3.3%, 5.4%として、組み合わせを変えてSDS-PAGEを実施し、各タンパク質の相対移動度を電気泳動写真上で比較した (図1)。その結果、BIS濃度が高いほど相対移動度が小さくなることが確認できた。

次に、BIS濃度を3.3%で統一し、分離ゲル濃度を7.5%, 12.5%としたゲルを用いてSDS-PAGE

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) における SDS が与えるリン酸化タンパク質の相対移動度への影響

を行い、同様に比較した (図2)。その結果、分離ゲル濃度が7.5%と12.5%では、後者の方が相対移動度は小さくなることが確認できた。

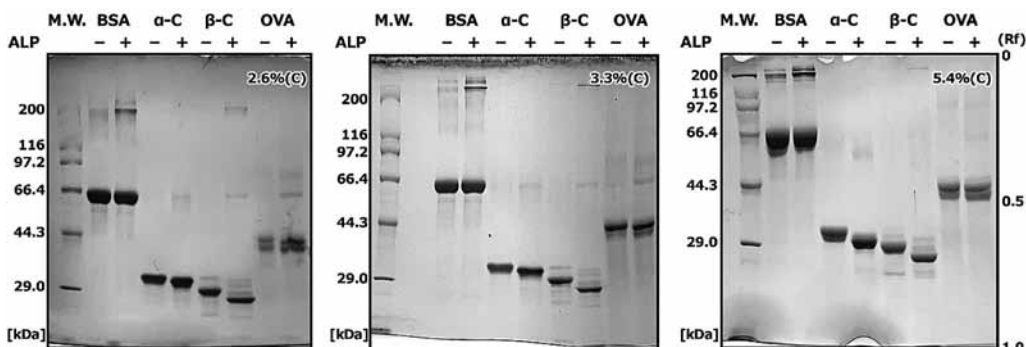


図1 分離ゲル濃度を10% (T) と統一し、BIS濃度を2.6% (C) (左), 3.3% (C) (中央), および5.4% (C) (右) のゲルを用いて実施したSDS-PAGEの典型例。

Rf: 相対移動度, M.W.; 分子量マーカー, α -C; α -カゼイン, β -C; β -カゼイン

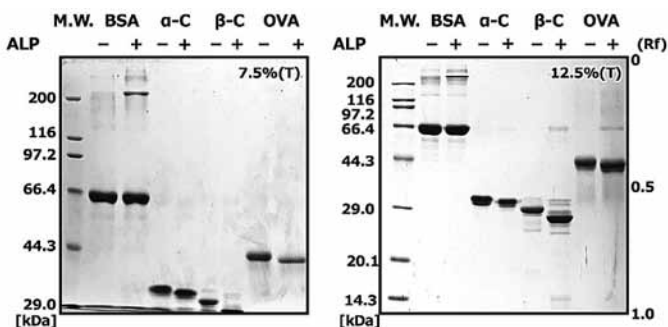


図2 BIS濃度を3.3% (C) と統一し、分離ゲル濃度を7.5% (T) (左) と12.5% (T) (右) のゲルを用いて実施したSDS-PAGEの典型例。

Rf: 相対移動度, M.W.; 分子量マーカー, α -C; α -カゼイン, β -C; β -カゼイン

3.2. ALP処理の有無と相対移動度の変動について

本実験で使用した4種類のタンパク質試料は、BSAが非リン酸化タンパク質であり、 α -カゼイン、 β -カゼイン、及びOVAはリン酸化タンパク質である。 α -カゼイン、 β -カゼイン、及びOVAには、それぞれ分子内にリン酸基が8個、5個、及び1~2個付加している²¹⁻²³。これらの4種類のタンパク質の相対移動度がALP処理 (脱リン酸化処理) により変動するか否かを確認するため、ALP処理なし (ALP:-) とあり (ALP:+) のタンパク質試料を用いてSDS-PAGEを実施した。

BIS濃度を2.6%で統一し、分離ゲル濃度を7.5%、10%、12.5%、15%としたゲルを用いてSDS-PAGEを行い、各タンパク質の相対移動度を電気泳動写真上で比較した (図3)。その結果、非リン酸化タンパク質であるBSAについては、ALP処理の有無によって相対移動度に変動は認められなかったが、リン酸化タンパク質である α -カゼイン、 β -カゼイン、及びOVAについては、ALP処理によってそれぞれの相対移動度は大きくなった (ALP:+のレーン)。特に、分子内に5個のリン酸基をもつ β -カゼインについては、相対移動度の変動は顕著であった。この結果は、

図1及び図2においても同様であった。

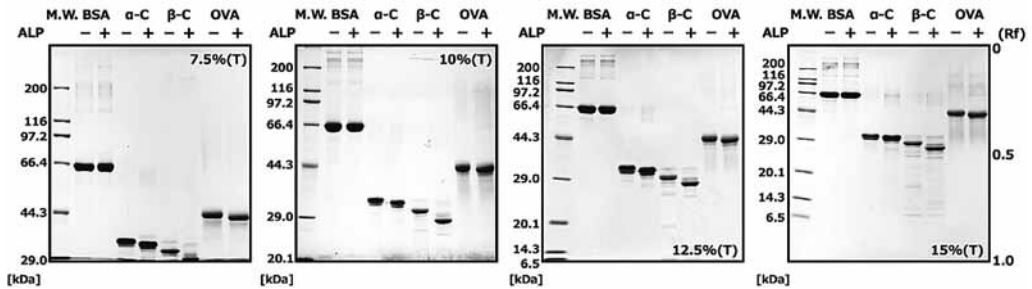


図3 BIS濃度を2.6%(C)と統一し、分離ゲル濃度を7.5%(T)~15%(T)のゲルを用いて実施したSDS-PAGEの典型例。Rf: 相対移動度, M.W.; 分子量マーカー, α -C; α -カゼイン, β -C; β -カゼイン

3.3. 様々な濃度の分離ゲルにおけるタンパク質分子量と相対移動度の関係について

図3のSDS-PAGEの結果をもとに、分離できたタンパク質の分子量とそれぞれの相対移動度との関係を調べた。本実験で用いたM.W.マーカーには、BSA (66.4kDa) とOVA (44.3kDa) 以外にも、ミオシン (200kDa)、 β -ガラクトシダーゼ (116kDa)、ホスホリラーゼB (97.2kDa)、炭酸脱水酵素 (29kDa)、トリプシンインヒビター (20.1kDa)、リゾチーム (14.3kDa)、及びアプロチニン (6.5kDa) が含まれる。各分離ゲル濃度におけるこれらのタンパク質の分子量と相対移動度の関係については、図4のグラフの通りとなった。このグラフより、分離ゲル濃度が7.5%~15%の範囲であれば、濃度が高いほどタンパク質の相対移動度が小さくなることが確認できた。ただし、このグラフにリン酸基を5個以上分子内にもつ α -カゼイン (リン酸基の数: 8個, 分子量: 約24kDa) と β -カゼイン (リン酸基の数: 5個, 分子量: 約24kDa) のRf値をプロットすると (破線の楕円)、タンパク質分子量と相対移動度との相関線からそれらが左側へ (←) と有意に逸脱する結果となった (図4)。

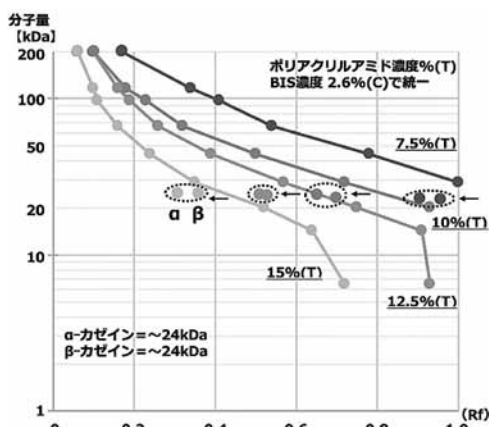


図4 分離ゲル濃度を7.5%(T)~15%(T)のゲルを用いて実施したSDS-PAGEにおけるタンパク質分子量と相対移動度との関係。
(α -カゼインと β -カゼインのRfプロットを追加)

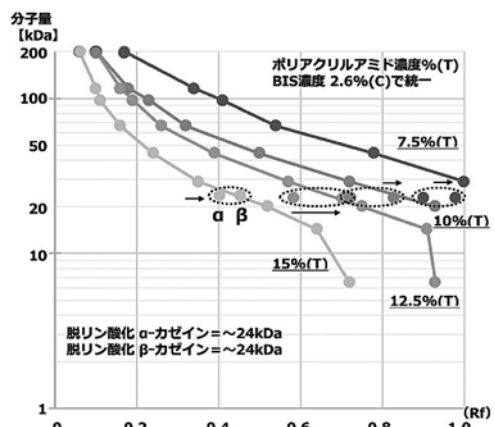


図5 分離ゲル濃度を7.5%(T)~15%(T)のゲルを用いて実施したSDS-PAGEにおけるタンパク質分子量と相対移動度との関係。
(脱リン酸化 α -カゼインと β -カゼインのRfプロットを追加)

さらに、ALP処理により脱リン酸化させた両カゼインのRf値をプロットするとそれらは右側へ(→)とシフトし、特に、β-カゼインのRf値は相関線値に極めて近似となった(図5、破線の楕円)。なお、図4及び図5のそれぞれのRfプロットは、3つ以上の独立したSDS-PAGEデータにおける平均値を示している。

3.4. タンパク質試料中のSDS濃度について

これまでの結果より、両カゼインタンパク質とOVAはALP処理をすることで相対移動度が大きくなることが確認できた。リン酸基の分子量が相対移動度に関係しているのであれば、ほぼ同じ分子量である両カゼイン(約24kDa)においては、リン酸基の数が多いα-カゼインの方がALP処理後の相対移動度は大きくなるはずである。しかし、SDS-PAGEの結果としては、β-カゼインの相対移動度の方が明らかに大きい値となった。また、リン酸基の分子量は約80Daであり、一般的なタンパク質の分子量5,000～200,000Daと比較すると極めて小さい値と言える。これらの理由より、リン酸基の分子量がSDS-PAGEにおけるタンパク質の相対移動度に影響を与えるとは考え難い。

SDS-PAGEにおいては、タンパク質試料を陰イオン系界面活性剤であるSDSや還元剤である2-メルカプトエタノールを含む溶液(SDS-PAGE用サンプルバッファー)を用いてタンパク質変性処理を行う。この処理により、様々な電荷や形状、分子量を持つタンパク質にはその分子量に応じた数のSDSが結合し、タンパク質分子全体が均一なマイナス電荷を帯びるようになる。リン酸化タンパク質は2価のリン酸基(-OPO₃²⁻)のマイナス電荷のために、その周辺にSDSが結合しにくくなり分子全体のマイナス電荷が減少する。つまり、リン酸基によるネガティブバリアが、タンパク質とSDSの結合を阻害し、電気泳動を抑制していることが考えられる(図6)。そこで、タンパク質変性処理に使用するSDS-PAGE用サンプルバッファー中のSDS濃度を低くすれば、タンパク質分子に帯電するマイナス電荷が減少し、SDS-PAGEにおけるタンパク質の相対移動度が小さくなるのではないかと、という仮説を立てた。

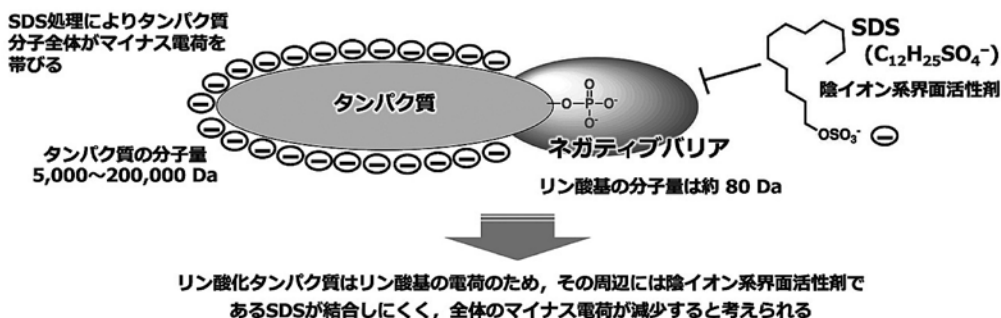


図6 リン酸基によるネガティブバリアがタンパク質とSDSの結合を阻害し、電気泳動を抑制している？

この仮説を検証するため、SDSの最終濃度が3.0%(w/v)、1.0%(w/v)、0.3%(w/v)、0%(w/v)になるようにSDS-PAGE用サンプルバッファー(3×)を調整し、これらを用いてタンパク質変性処理を施した後、それぞれのタンパク質試料をSDS-PAGE解析してタンパク質試料中のSDS濃度と相対移動度の関係を調べた(図7)。この実験では、試料中のSDS濃度が低いほどタンパク質の相対移動度は小さくなると予想したが、図7で示されているように、結果としてBSA、両カゼイン、OVAの全てのタンパク質試料においてSDS濃度を変えても相対移動度に大きな変化

は見られず、今回の条件下では試料中のSDS濃度による相対移動度の有意な差を見出すことはできなかった。その理由として、電気泳動装置の陰極側上方部位に設置するSDS-PAGE用泳動バッファー（陰極側上部泳動バッファー）に含まれるSDSが電気泳動の開始とともに陽極側へと下方移動し、濃縮ゲル中に存在するタンパク質試料と結合してタンパク質分子全体がマイナス電荷を十分に帯びてしまう可能性が考えられた。

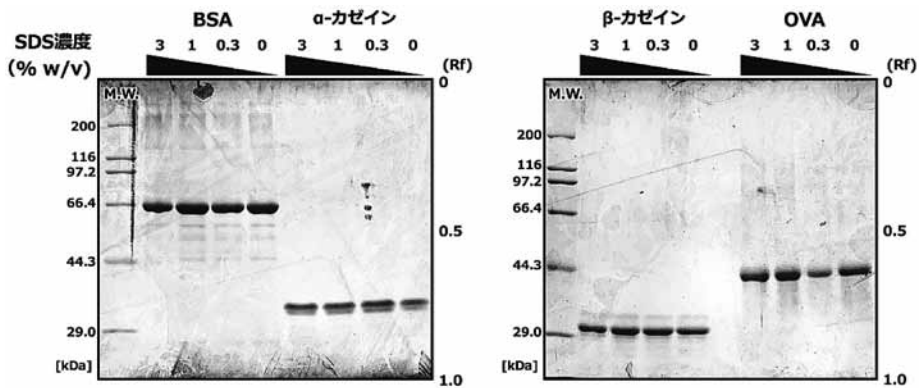


図7 タンパク質試料中のSDS濃度と相対移動度について検討するため、SDS濃度の異なるSDS-PAGE用サンプルバッファーで処理した試料を用いて実施したSDS-PAGEの典型例。

Rf; 相対移動度, M.W.; 分子量マーカー, 分離ゲル濃度は10% (T), BIS濃度は2.6% (C)

3.5. SDS-PAGEにおけるSDSが与える影響について

そこで、陰極側上部泳動バッファー中のSDS量を少なくすれば、タンパク質分子に帯電するマイナス電荷が減少し、SDS-PAGEにおけるリン酸化タンパク質の相対移動度が小さくなるのではないかという仮説を立て、まずは陰極側上部泳動バッファーよりSDSを除いて実験を行った。BIS濃度を2.6%で統一し、分離ゲル濃度を7.5%、10%、12.5%の条件下で分子量マーカー、両カゼインを試料としてSDS-PAGEを行った（図8）。その結果、通常のSDS-PAGE条件下と比較して、分子量マーカーは泳動バンドとしての検出は困難となり、 α -カゼインと β -カゼインの相対移動度は逆転した。

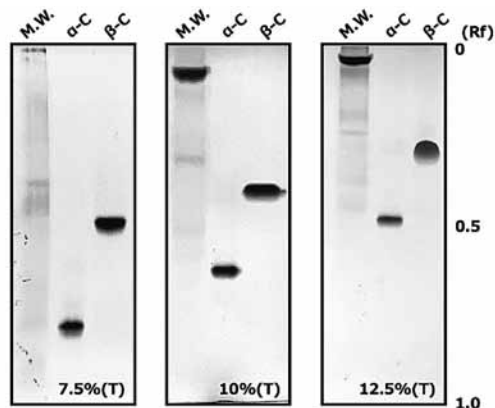


図8 SDSを含めない陰極側上部泳動バッファーを用いて実施したSDS-PAGEの典型例。

Rf; 相対移動度, M.W.; 分子量マーカー, a-C; α -カゼイン, β -C; β -カゼイン

さらに、陰極側上部泳動バッファの SDS 濃度を通常の 0.1% (w/v) から 1/5 ~ 1/50 希釈し (0.02% ~ 0.002%), どの SDS 濃度までが正常に電気泳動されるのかを検討するため、分離ゲル濃度を 12.5%, BIS 濃度を 2.6% での条件下で SDS-PAGE を行った (図 9)。その結果、0.006% 以下の濃度で α -カゼインと β -カゼインの相対移動度は逆転した。

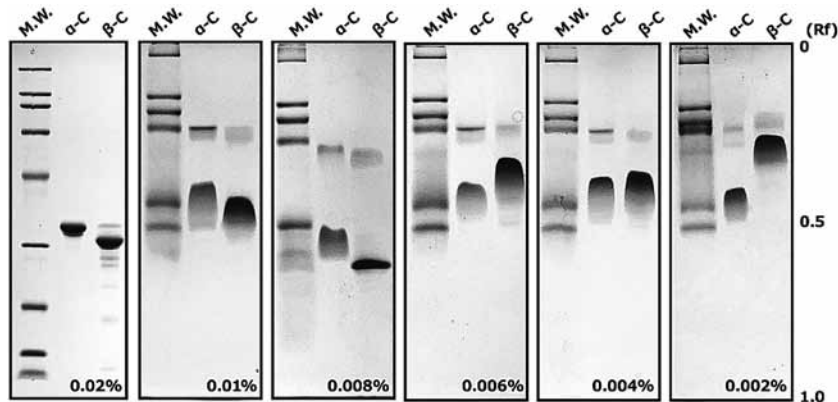


図 9 陰極側上部泳動バッファの SDS 濃度を 0.02 ~ 0.002% (w/v) にして実施した分離ゲル濃度 12.5% (T), BIS 濃度 2.6% (C) 条件下の SDS-PAGE の典型例。
Rf: 相対移動度, M.W.: 分子量マーカー, α -C: α -カゼイン, β -C: β -カゼイン

最後に、SDS 濃度 3% ~ 0% (w/v) のサンプルバッファと SDS 濃度 0.02% (w/v) と 0.01% (w/v) の陰極側上部泳動バッファを用いて、分離ゲル濃度 12.5%, BIS 濃度 2.6% の条件下で SDS-PAGE を行った (図 10)。タンパク質試料は、BSA, α -カゼイン, β -カゼイン, 及び OVA の 4 種類を用いた。その結果、SDS 濃度 0% (w/v) のサンプルバッファでは、BSA と OVA の泳動は阻害され、また、0.01% (w/v) の陰極側上部泳動バッファでは、 β -カゼインの相対移動度が著しく小さくなり、 β -カゼインと OVA の相対移動度は逆転した。

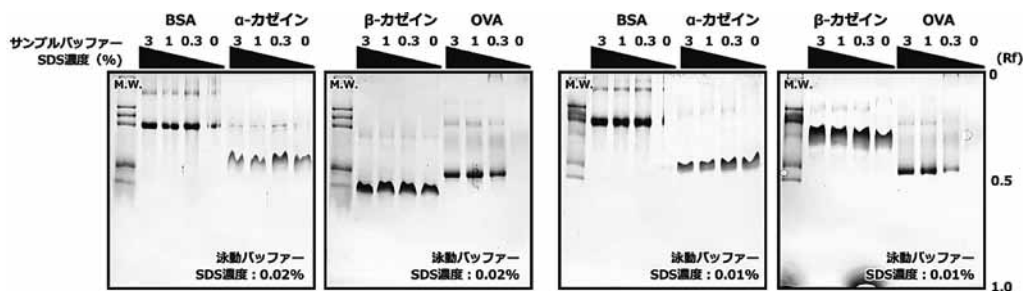


図 10 SDS 濃度 3% ~ 0% (w/v) のサンプルバッファと SDS 濃度 0.02 と 0.01% (w/v) の陰極側上部泳動バッファを用いた分離ゲル濃度 12.5% (T), BIS 濃度 2.6% (C) 条件下の SDS-PAGE の典型例。
Rf: 相対移動度, M.W.: 分子量マーカー

4. 考 察

本研究においては、BSA, α -カゼイン, β -カゼイン, OVA の 4 種類をタンパク質試料として調整し、M.W. マーカーと共に以下の 5 つの実験項目について検討した。

- 3.1. 分離ゲルの支持体濃度と架橋剤濃度について
- 3.2. ALP処理の有無と相対移動度の変動について
- 3.3. 様々な濃度の分離ゲルにおけるタンパク質分子量と相対移動度の関係について
- 3.4. タンパク質試料中のSDS濃度について
- 3.5. SDS-PAGEにおけるSDSが与える影響について

実験項目3.1.において、分離ゲル濃度を10%で統一し、BIS濃度を2.6%、3.3%、5.4%として、それぞれ組み合わせを変えてSDS-PAGEを行った。その結果、BIS濃度が高いほど相対移動度が小さくなることが確認できた。この結果より、架橋剤であるBISの濃度が高いほど分子篩となる網目構造がより細くなるため、より小さい分子量のタンパク質を篩い分けすることができることを確認した(図1)。次に、BIS濃度を3.3%で統一し、分離ゲル濃度を7.5%と12.5%として、それぞれ組み合わせでSDS-PAGEを行った。その結果、支持体濃度が高くなれば相対移動度が小さくなることも確認できた(図2)。

実験項目3.2.において、ALP処理(+), 未処理(-)の4種類のタンパク質試料を、BIS濃度を2.6%で統一し、分離ゲル濃度を7.5%, 10%, 12.5%, 15%としたゲルを用いてSDS-PAGE解析し、各タンパク質の相対移動度を比較した。その結果、リン酸化タンパク質である両カゼインタンパク質とOVAは、ALPによる脱リン酸化処理により相対移動度が大きくなった(図3)。とりわけ、分子内に5個のリン酸基をもつ β -カゼインについては、相対移動度の変動は顕著であり、この結果は、実験項目3.1.の図1及び図2においても同様であり、再現性を確認することができた。

実験項目3.3.において、実験項目3.2.の解析結果をもとに分離できたタンパク質の分子量とそれぞれの相対移動度との関係を調べると、図4と図5のようなグラフに表すことができた。分子内に多くのリン酸基をもつ α -カゼインと β -カゼインのRfプロットは、タンパク質分子量と相対移動度との相関線から左側に(←)逸脱する結果となった(図4, 破線の楕円)。これは、両カゼインタンパク質の相対移動度が一般的なタンパク質の相対移動度と比べて小さいことを意味している。両カゼインタンパク質をALP処理により脱リン酸化させると、それらのRfプロットは右側へ(→)とシフトし、特に、 β -カゼインのRf値は相関線値に極めて近似となった(図5, 破線の楕円)。つまり、両カゼインタンパク質を脱リン酸化させることで、それらの相対移動度はタンパク質のスタンダードな相対移動度により近い値になることが示された。これらの結果から、仮に α -カゼインや β -カゼインをM.W.マーカーとして利用する場合には、それらの脱リン酸化処理は必須であることが示された。また、分子量の比較的小さいカゼインのようなリン酸化タンパク質は相対移動度が有意に小さくなることが示され、未知のタンパク質の分子量を測定する際には、リン酸化のような翻訳後修飾について留意しなければならない。

これまでの結果より、リン酸化タンパク質である両カゼインとOVAはALP処理をすることで相対移動度が大きくなることが確認できた。SDS-PAGEにおけるリン酸化タンパク質の相対移動度が脱リン酸化タンパク質のそれよりも小さくなる現象の原因として、リン酸基の2個の負電荷(-OPO₃²⁻)がタンパク質とSDSの結合を阻害して電気泳動を抑制しているのではないかと考えた(図6)。それを検証するため、実験項目3.4.においてタンパク質試料中のSDS濃度を3%~0%(w/v)に変えることで、SDS濃度と相対移動度の関係を調べた。この実験では、SDS濃度が低いほどタンパク質の相対移動度は小さくなると予想した。しかしながら、今回の実験条件下では試料中のSDS濃度による相対移動度の有意な変動を見出すことはできず、SDSを含まない0%(w/v)のタンパク質試料でも他のSDS濃度と同様、正常に電気泳動できるという結果となった(図7)。タンパク質試料にSDSが含まれなくても正常な電気泳動が可能であった理由としては、SDS-PAGE用泳動バッファーに含まれるSDSに起因するものと推測された。

そこで実験項目3.5.において、SDSがリン酸化タンパク質の相対移動度に与える影響について、本実験で使用する泳動バッファーやサンプルバッファーに含まれるSDSの濃度を変えながら検討を行った。本研究では、陰極側上部泳動バッファー中のSDS量を少なくすれば、タンパク質分子に帯電するマイナス電荷が減少し、SDS-PAGEにおけるリン酸化タンパク質の相対移動度が小さくなるのではないかとこの仮説を立て、まずは陰極側上部泳動バッファーよりSDSを除いて実験を行った。その結果、通常のSDS-PAGE条件下と比較して、分子量マーカーの泳動は乱れてバンドとしての検出が困難となり、リン酸化タンパク質である α -カゼインと β -カゼインの相対移動度は逆転した(図8)。次に、陰極側上部泳動バッファーのSDS濃度を通常の0.1% (w/v) から1/5～1/50希釈したものを用いてSDS-PAGEを行った(図9)。その結果、0.006% (w/v) 以下の濃度で α -カゼインと β -カゼインの相対移動度は逆転したが、0.008% (w/v) 以上の濃度ではその逆転は観察されなかった。なかでも、0.02% (w/v) の泳動バッファーにおいては、通常のSDS-PAGE条件下の泳動パターンとほとんど違いはなく正常に電気泳動が行われていた。この結果は、現状の泳動バッファーの組成を改善し、SDSの節約プロトコル考案の一助になることを示している。最後に、SDS濃度3%～0% (w/v) のサンプルバッファーとSDS濃度0.02% (w/v) と0.01% (w/v) の陰極側上部泳動バッファーを用いて検討を行った。その結果、SDS濃度0% (w/v) のサンプルバッファーでは、BSAとOVAの泳動は阻害され、また、0.01% (w/v) の陰極側上部泳動バッファーでは、 β -カゼインの相対移動度が著しく小さくなり、 β -カゼインとOVAの相対移動度は逆転した(図10)。以上より、SDS-PAGEを行う上では適度な濃度のSDSは必須であり、SDSの量が少なくなるほど電気泳動は阻害され、影響が非常に大きいことが分かった。SDS-PAGEを行う上でSDSが与える影響は甚大で、SDS-PAGEにおけるリン酸化タンパク質の相対移動度が小さくなる原因を泳動バッファーやサンプルバッファーに含まれるSDSの濃度を変えながら明確にすることは困難であることが示された。

5. 結 論

生命システムの基本的理解や病態発症メカニズムの解明のために、タンパク質を標的とした様々な研究が行われている。そのような生命科学の研究領域において、タンパク質を分離分析する手法として、SDS-PAGEは広く用いられている。本研究において、我々は、数種のタンパク質をSDS-PAGEにより解析し、様々な条件下におけるタンパク質の分子量と相対移動度の関係について、その特徴や性質の理解を深めることを目的として実験を行った。また、SDS-PAGEにおけるリン酸化タンパク質の移動速度が脱リン酸化タンパク質の移動速度よりも遅くなる現象に注目し、SDSが与えるリン酸化タンパク質の相対移動度への影響について調べた。その結果、SDS-PAGEにおける相対移動度は、分離ゲルの支持体や架橋剤の濃度によって影響を受けること、また、タンパク質の翻訳後修飾の1つであるリン酸基の付加によって有意に影響を受ける場合があることが明らかとなった。よって、解析するタンパク質によってはこれらの点を十分に留意しながら、様々な条件下で検討する必要があると結論した。さらに、SDSがリン酸化タンパク質の相対移動度に与える影響を本実験で使用するサンプルバッファーや泳動バッファーに含まれるSDSの濃度を変えながら検討した結果、両者のバッファー中のSDS濃度が低くなるほど電気泳動は阻害されリン酸化タンパク質の相対移動度は著しく小さくなったが、それと同時に、分子量との関係も大きく乱れた。SDS-PAGEを行う上でSDSが与える影響は甚大で、SDS-PAGEにおけるリン酸化タンパク質の相対移動度が小さくなる原因をサンプルバッファーや泳動バッファーに含まれるSDSの濃度を変えながら見出すことは極めて困難であるという結論に至った。

※ 本研究は、科学研究費補助金（課題番号：19K071470, 21K06455, 24K09710）の補助を受けた。なお、本論文に関して、開示すべき利益相反関連事項はない。

参 考 文 献

- 1) 菅野浩. 電気泳動法の発展の歴史. 生物物理化学. 1977; 21: 151-158.
- 2) 菅健一. 5. 電気泳動法. 化学と生物. 1989; 27: 264-269.
- 3) 島尾和男. 電気泳動法の基礎知識. 生物物理化学. 1997; 41: 1-11.
- 4) 中村和行. 電気泳動法のトリロジー. 生物物理化学. 2012; 56: 1-4.
- 5) 平井秀松, 島尾和男. 第1章 電気泳動法概論『電気泳動実験法』電気泳動学会編. 東京: 文光堂; 1963年. 1-29頁.
- 6) 井上勤. 電気泳動論法概論『新版電気泳動実験法』電気泳動学会編. 東京: 文光堂; 1989年. 1-20頁.
- 7) 中村和行. 第1章 電気泳動法小史『最新電気泳動実験法』日本電気泳動学会編. 東京: 医歯薬出版; 1999年. 1-4頁.
- 8) 福田青郎. 濃縮ゲルだヨ！タンパク集合. 生物工学会誌. 2011; 89: 332-335.
- 9) Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 1970; 227: 680-685.
- 10) Smith BJ. SDS polyacrylamide gel electrophoresis of proteins. Methods Mol Biol. 1994; 32: 23-34.
- 11) Brunelle JL, Green R. One-dimensional SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (1D SDS-PAGE). Methods Mol Biol. 2014; 541: 151-159.
- 12) Weber K, Pringle JR, Osborn M. [1] Measurement of molecular weights by electrophoresis on SDS-acrylamide gel. Methods Mol Biol. 1972; 26: 3-27.
- 13) Matsumoto H, Haniu H, Komori N. Determination of protein molecular weights on SDS-PAGE. Methods Mol Biol. 2019; 1855: 101-105.
- 14) Kain SR, Henry HL. Quantitation of proteins bound to polyvinylidene difluoride membranes by elution of Coomassie brilliant blue R-250. Anal Biochem. 1990; 189: 169-172.
- 15) Brunelle JL, Green R. Coomassie blue staining. Methods Enzymol. 2014; 541: 161-167.
- 16) Gauci VJ, Padula MP, Coorsen JR. Coomassie blue staining for high sensitivity gel-based proteomics. J Proteomics. 2013; 90: 96-106.
- 17) 木下英司, 木下恵美子, 小池透. Phos-tag電気泳動法を用いた高分子量リン酸化タンパク質の質的・量的変動モニタリング法. 生化学. 2010; 82: 857-862.
- 18) 木下英司. リン酸化プロテオミクスのためのPhos-tag技術の開発とその応用. 日本プロテオーム学会誌. 2019; 4: 49-60.
- 19) DeGnove JP, Qin J. Fragmentation of phosphopeptides in an ion trap mass spectrometer. J Am Soc Mass Spectrom. 1998; 9: 1175-1188.
- 20) Kinoshita E, Kinoshita-Kikuta E, Takiyama K, Koike T. Phosphate-binding tag, a new tool to visualize phosphorylated proteins. Mol Cell Proteomics. 2006; 5: 749-757.
- 21) Kinoshita E, Yamada A, Takeda H, Kinoshita-Kikuta E, Koike T. Novel immobilized zinc (II) affinity chromatography for phosphopeptides and phosphorylated proteins. J Sep Sci. 2005; 28: 155-162.
- 22) 山内邦男, 上野川修一. カゼインに関する最近の研究～特にその構造を中心として～. 日本畜産学会報. 1972; 43: 543-553.
- 23) Kinoshita-Kikuta E, Kinoshita E, Koike T. Separation and identification of four distinct serine-phosphorylation states of ovalbumin by Phos-tag affinity electrophoresis. Electrophoresis. 2012; 33: 849-855.

—2024年9月24日 受理—