

Title	ポリアクリルアミドゲルを用いた蛋白質のアフィニティータラップゲル電気泳動法の開発と応用
Author(s)	栗田, ちひろ
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	http://hdl.handle.net/11094/49751
DOI	
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/repo/ouka/all/>

氏名	栗田 ちひろ
博士の専攻分野の名称	博士(理学)
学位記番号	第 22452 号
学位授与年月日	平成20年9月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 理学研究科化学専攻
学位論文名	ポリアクリルアミドゲルを用いた蛋白質のアフィニティトラップゲル 電気泳動法の開発と応用
論文審査委員	(主査) 教授 高尾 敏文 (副査) 教授 深瀬 浩一 教授 村田 道雄 准教授 佐藤 孝

論文内容の要旨

近年プロテオーム研究の進歩により、生理的に重要な蛋白質が多く見出されてきているが、その次の段階として、様々な生理的条件下でそれらの蛋白質と相互作用して機能を発現する蛋白質(群)の探索は急務となってきている。

ポリアクリルアミドゲル電気泳動法(PAGE)は、微量蛋白質の分離・分析技術として優れ、プロテオーム研究には欠かせない手法の一つであり、蛋白質のサイズや電荷による分離のみならず、種々の添加剤を加えることで多様な分離が行える方法である。

この PAGE を利用した生体分子間の相互作用解析法としてアフィニティ電気泳動法が知られている。この方法はリガンド分子を非固定または固定化した PAGE ゲルを利用した蛋白質の電気泳動法で、泳動速度の遅れによって蛋白質とリガンド分子との親和性を検出することができるが、複雑な混合物に対して応用するのは難しい。

本研究では、特定のリガンド(蛋白質、ペプチド等)に対して親和性をもつ蛋白質の網羅的な検出・同定を PAGE で一挙に可能とする方法として“アフィニティトラップゲル電気泳動法”を新たに考案、開発し、さらにその有効性を示した。本法は以下の5つの手順からなる。1) ポリアクリルアミドゲルに共有結合にてリガンドを固定化したゲルを調製、2) 生体から得られた蛋白質試料を通常の PAGE を利用して分離、3) ゲル中に保持された蛋白質成分を1) で調製したリガンド固定化ゲルに電氣的に一度に転写、通過させ、4) リガンドと特異的に相互作用する蛋白質(群)を一挙に検出、5) 検出された蛋白質を質量分析等により同定する。

リガンドの固定化は、ポリアクリルアミドゲルの調製時に用いる架橋剤 *N,N'*-Methylene-bisacrylamide (BIS) に着目し、SH 基含有化合物のマイケル付加反応を利用することにより行った。蛋白質やペプチドの SH 基を直接 BIS と反応させることによりペプチド-BIS 付加体を作成し、その後に、モノアクリルアミド/BIS とのラジカル共重合によりリガンド固定化ゲルを調製した。リガンドとして抗原ペプチド(システインを1残基含有する)を用いて固定化した例では、ペプチドは95%以上の効率でゲルに固定化された。そのゲルを用いて抗体分子の検出を行った結果、抗ペプチド抗体のみが特異的にゲルに保持されることが明らかとなった。

また、遊離の SH 基を持たない蛋白質リガンドの例としてトリプシンの固定化を行った。蛋白

質表面のアミノ基へ SH 基を導入した後、上記と同様にゲルに固定化した。調製したトリプシン固定化ゲルを用いて、実際の生体試料に応用し、トリプシンに対して高い親和性を示す大豆由来トリプシンインヒビターを複雑な混合物から一段回で単離、検出することに成功した。

論文審査の結果の要旨

プロテオミクス研究において、近年、生体試料に対して機能や特定の構造に注目した網羅的解析が重要となっている。その中で主として利用されているアフィニティークロマトグラフィーやプルダウン法は、微量試料への適用が難しいことや、支持体への非特異的吸着がしばしば問題となっている。本論文では、特定のリガンド(蛋白質、ペプチド等)に対して親和性をもつ蛋白質の網羅的な検出・同定をポリアクリルアミドゲル電気泳動法(PAGE)を利用して一挙に行うことのできる新たな方法として、“アフィニティトラップゲル電気泳動法”を考案し、その応用に成功している。

特に、トリプシン固定化ゲルを用いて、複雑な混合物である生体試料(大豆粉末)から、トリプシンに対して高い親和性を示す大豆由来トリプシンインヒビターを一段回で単離、検出できている点は高く評価される。

本法は、非特異的な吸着が少なく微量蛋白質に応用可能であり、リガンドと相互作用する蛋白質を網羅的に検出・同定することのできる新たな方法として有用であると考えられる。

以上により、本論文は博士(理学)の学位論文として十分価値あるものと認める。