〔特集：最新の電気泳動技術〕

超分子ヒドロゲルを支持体としたタンパク質電気泳動法の開発

山中 正道

静岡大学大学院理学研究科化学専攻

Development of protein electrophoresis using supramolecular hydrogel

Masamichi Yamanaka

E-mail: smyaman@ipc.shizuoka.ac.jp

(受付 2014 年 6 月 7 日, 受理 2014 年 6 月 14 日)

はじめに

タンパク質の電気泳動の歴史は、1930 年代の Tiselius による自由溶液中における血清タンパク質の分離に端を発する¹⁾。その後、ゾーン電気泳動法としてゲルを支持体とする電気泳動が開発された。ポリアクリルアミドゲルを支持体とするタンパク質の電気泳動は、1959 年に初めて報告され、半世紀以上が経過した現在においても、タンパク質の電気泳動には不可欠な支持体として汎用されている²⁾。特に、陰イオン性界面活性剤であるドデシル硫酸ナトリウム (SDS) 存在下で行うポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (SDS-PAGE) は、大学の研究室ではもちろん、学生実験において行われるほど一般的な技術として普及している。化学者である著者の視点から電気泳動の現状を眺めたとき、この分野はきわめて成熟した領域に見えた。ところが、これらの技術のユーザーである生命科学者との会話から、彼らは現状の電気泳動法に必ずしも満足しているわけではないことがわかってきた。とりわけ、電気泳動後のタンパク質試料の回収については、煩雑かつ非効率的であることに不満を感じている研究者が多いようであった。

そこで我々は、生命科学者の不満を解消する新技術として、ポリアクリルアミドゲルに代わり、低分子量化合物の自己集合により構築される超分子ゲルを支持体とする電気泳動法を着想した。非共有結合を駆動力に形成する超分子ゲルは、その形成と崩壊に高い可逆性を有することから、電気泳動後の高効率な試料回収が可能になると考えた。また、新規な支持体を電気泳動に適用することで、異なる分離様式の発現も期待できる。さらには、ゲルの構成単位となる低分子量化合物の分子設計に応じて、様々なアフィニティー電気泳動の開発も可能になると考えた。以下、我々の開発した超分子ゲル電気泳動 (SUGE: Supramolecular Gel Electrophoresis) について紹介する。

界面活性剤により誘導される超分子ヒドロゲル³⁾

我々は、ベンゼンを母核とする種々の三回対称トリスウレア分子を合成し、それらが有機溶媒または水の中でゲル化できることを見いだしてきた⁴⁾。低分子ヒドロゲル化剤としての機能を期待し、疎水性の三回対称トリスウレア分子に親水基を導入した両親媒性分子 **1** を低分子ヒドロゲル化剤として設計、合成した (図1)。両親媒性分子 **1** と水の混合物は懸濁液になったが、ここに界面活性剤である SDS を添加すると超分子ヒドロゲルが得られた。超分子ヒドロゲルの形成において、SDS 濃度は重要であり、適切な濃度以下では懸濁液が、適切な濃度以上では透明な溶液がそれぞれ得られた。また、適切な濃度の SDS を添加し形成した超分子ヒドロゲルにおいて、添加する SDS の増加に伴いゲルの透明度が向上することが明らかとなった。ゲル化を誘導する界面活性剤は、SDS に限定されることなく、種々の陰イオン性界面活性剤、陽イオン性界面活性剤も同様に機能した。

キセロゲルの走査型電子顕微鏡 (SEM) 観測を行ったところ、界面活性剤の濃度により繊維状集合体の太さに変化が見られた。界面活性剤濃度の上昇に伴い、繊維状集合体は細くなる。この結果より、両親媒性分子 **1** とイオン性界面活性剤による超分子ヒドロゲルの形成メカニズムを以下のように考察した。両親媒性分子 **1** は水中において自己集合し、無秩序なバンドル化により不溶性の沈殿物を形成する。イオン性界面活性剤の疎水部は、繊維状集合体と疎水性相互作用により会合する。その結果、繊維状集合体表面に配置された界面活性剤の親水部の静電反発により、過度なバンドル化が解消され超分子ヒドロゲルが形成されたと考えられる。

図1 両親媒性分子1の構造式と、界面活性剤により誘導されるゲル化泳動

超分子ヒドロゲルを支持体としたタンパク質試料の電気泳動⁵⁾

両親媒性分子1は、一般的なSDS-PAGEにおいて用いられるTGS緩衝液(Tris: 25 mM; Glycine: 195 mM; SDS: 0.10%)をゲル化した。そこで、この超分子ヒドロゲルを支持体としたタンパク質試料の電気泳動を検討することとした(図2)。種々の検討結果により、以下に示す実験手順を確立した。1) 超分子ヒドロゲルをガラスキャピラリーに充填する(φ 2 mm, 8 cm)。電気泳動後のゲルの操作において十分な物理的強度が必要であるため、2.0 wt%の両親媒性分子1に2.0 wt%のアガロースを加えた超分子ヒドロゲルを用いた。ただし、アガロースのみではタンパク質試料は電気泳動により分離されない。2) 超分子ヒドロゲルを充填したガラスキャピラリーの一端にタンパク質試料を充填する。3) サブマリン型電気泳動装置を用い電気泳動を行う。移動相にはTGS緩衝液を用い、100 Vで150分前後電気泳動する。4) キャピラリーからゲルを取り出し、8等分に分割する。5) 分割したゲルよりタンパク質試料を抽出する。6) 抽出し

た溶液をSDS-PAGE, 続いてCBB染色することで、超分子ヒドロゲル中でのタンパク質の分離様式を解析する。

5)の抽出条件を種々検討した結果、電気泳動後のゲルに緩衝液を加え遠心分離を行うというきわめて単純な操作で、50%程度のタンパク質が抽出されることが明らかとなった。同様の操作にて、ポリアクリルアミドゲルからタンパク質の抽出を行っても、タンパク質はほとんど抽出されなかった。超分子ヒドロゲルは、可逆的な構造変化が可能であるため、遠心分離の際に、集合体構造が崩壊し効率的にタンパク質が抽出されたと考察している。

超分子ヒドロゲルを支持体とした電気泳動(SDS-SUGE)で、種々の分子量のタンパク質試料(6.5 kDa–116 kDa)を用いて検討した。β-ガラクトシダーゼ(116 kDa)とオブアルブミン(45 kDa)の混合物を電気泳動したところ、β-ガラクトシダーゼは6～8レーンに検出され、オブアルブミンはより陽極側の4～7レーンに検出された。分子量の小さなオブアルブミンがより陽極側に移動する分離様式は、既存のSDS-PAGEと同様であった。ところが、分子量が45 kDa(オブアルブミン)よりも小さな分子量のタンパク質を用いた超分子ゲル電気泳動では、SDS-PAGEとは異なり、分子量の小さなタンパク質ほど陽極側への移動度が小さくなる分離様式が見いだされた。例えば、オブアルブミン(45 kDa)とアプロチニン(6.5 kDa)の混合物を電気泳動したところ、オブアルブミンは3～5レーンに検出され、アプロチニンはより陰極側の7レーンに検出された。リゾチーム(14.4 kDa)とアプロチニンの電気泳動では、リゾチームが4, 5レーンに検出され、アプロチニンは6レーンに検出された。一般的に、SDS-PAGEは、低分子量のタンパク質の分離を不得手としているが、SDS-SUGEでは、わずか2.0 wt%のゲルで15 kDa未満のタンパク質の分離を達成した。このSDS-SUGEにおいては、一般的な「電気泳動に見られる分子ふるい効果」と「ゲル濾過などに見られる分子ふるい効果」という2種類の分子ふるい効果が機能し、このような特徴的な分離様式が発現したと考察している。

おわりに

我々は、タンパク質の電気泳動における新規な支持体として、超分子ヒドロゲルが適用可能であることを示した。SDS-SUGEにおいては、SDS-PAGEでは見られない特異な分離様式や、高効率なタンパク質試料の回収などの優れた特性も示すことができた。現在は、未変性タンパク質の電気泳動へと、超分子ヒドロゲルの適用範囲を拡大すべく検討を行っている。

タンパク質電気泳動の支持体として、超分子ヒドロゲルは多くの可能性を秘めている。しかし、生命学者が汎用できる技術として確立するためには、まだまだ多くの課題

文 献

- 1) Tiselius A. Electrophoresis of serum globulin. I. *Biochem J.* **1937**; 31: 313–317.
- 2) Raymond S, Weintraub L. Acrylamide gel as a supporting medium for zone electrophoresis. *Science* **1959**; 130: 711.
- 3) Jinno Y, Yamanaka M. Ionic surfactants induce amphiphilic tris(urea) hydrogel formation. *Chem Asian J.* **2012**; 7: 1768–1771.
- 4) a) Yamanaka M, Nakamura T, Nakagawa T, Itagaki H. *Tetrahedron Lett.* **2007**; 48: 8990–8993; b) Yamanaka M. *J Incl Phenom Macrocycl Chem.* **2013**, 77, 33–48 (Review).
- 5) Yamamichi S, Jinno Y, Haraya N, Oyoshi T, Tomitori H, Kashiwagi K, Yamanaka M. Separation of proteins using supramolecular gel electrophoresis. *Chem Commun.* **2011**; 47: 10344–10346.

が残されている。半世紀にわたり世界中で利用されるPAGEからすると、産声をあげたばかりのSUGEはまだまだ未熟である。しかし、SUGEの可能性を信じ、この技術を成熟させ、電気泳動の選択肢として生命科学者がSUGEをチョイスできる日を目指したい。

図2 超分子ゲル電気泳動 (SDS-SUGE) の手順と、タンパク質の分離様式