

I. タンパク質の分離法

どうやって目的タンパク質を単離するのか？

1. 生体組織からのタンパク質分画法

1-1. 抽出法

1-2 分別沈殿

1-3 分子量による分画

2. クロマトグラフィー

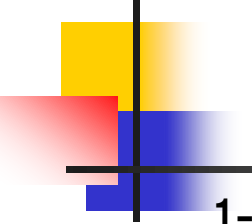
2-1 イオン交換

2-2 ゲルろ過

2-3 アフィニティー

2-4 疎水性

2-5 逆相HPLCによる分離



1. 生体組織からのタンパク質分画法

1-1. 抽出法

・物理的抽出法

ホモジナイザーによる摩砕

→動物組織

超音波処理

→微生物など

凍結融解

→臓器など

加圧破碎

→植物、真核生物

・化学的抽出法

pH、イオン強度の変化(浸透圧ショック)→溶血

有機溶媒(アセトン、クロロホルムなど)→脂溶性物質の除去

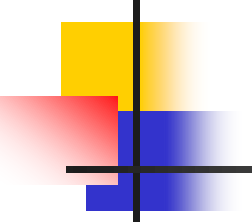
酵素処理

→細胞壁分解酵素

・特殊なタンパク質の抽出法

界面活性剤による可溶化
(イオン性、非イオン性)

→膜タンパク質など



1.生体組織からのタンパク質分画法

1-2 分別沈殿

→大量の粗抽出試料を分離、濃縮

- ・塩析

タンパク質の水に対する溶解度

→低塩濃度で上昇(塩溶, salting-in) → 塩の種類によらない

→高濃度で減少(塩析, salting-out) → 塩の種類に依存

塩によりタンパク質表面の水が奪われるため

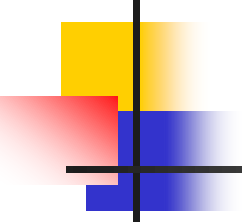
硫酸アンモニウムが一般につかわれる

- ・水に対する溶解度が高く、溶解度の温度変化少ない。

- ・有機溶媒による沈殿

エタノール、メタノール、アセトン、トリクロロ酢酸など

→血液などの粗分画に有効



1.生体組織からのタンパク質分画法

1-3 分子量による分画

タンパク質の粗分画と脱塩→分子量による粗分画が有効

- ・透析法

試料をセロハン製のチューブにいれ、外液に水もしくは低濃度の緩衝液



塩濃度は平衡になるため、試料中の低分子物質を除去できる

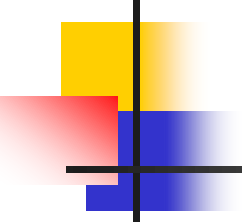
- ・限外ろ過法

膜孔(分画分子量)が選択できる。

限外ろ過膜により大量に分画することが可能

- ・ N_2 ガスなどによる加圧式

- ・遠心分離式



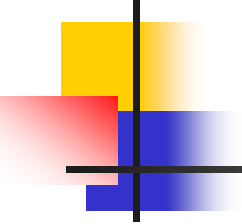
2.クロマトグラフィー

種々の原理で、さまざまなタンパク質を分離する

2-1 イオン交換クロマトグラフィー (IEC)

荷電基を持つ充填剤が、反対の電荷を持つ分子と静電的に相互作用し、保持される

- ・担体と荷電基の選択により、分離能が異なる。
- ・陽イオン交換クロマトグラフィー
カルボキシメチル(CM)など→マイナスイオンの荷電基を持つ
- ・陰イオン交換クロマトグラフィー
ジエチルアミノエチル(DEAE)など→プラスイオンの荷電基を持つ
- ・担体としては、セルロース、デキストラン、アガロースが用いられる。
- ・交換するイオンとしては、 Na^+ , Cl^- などが用いられる。



2.クロマトグラフィー

2-2 ゲルろ過クロマトグラフィー (GFC)

分子の大きさ(分子量)により分離する方法。

多孔質の担体に試料を添加すると、高分子のものは孔に入り込めず、低分子のものは逆に入り込む。従って、高分子のものは先に溶出する。

K_{av} をゲル体積のうち、溶質分子が入り込める体積と定義する。

$$K_{av} = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0}$$

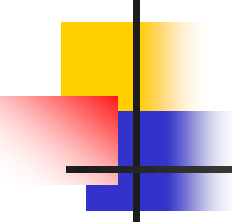


V_0 :ゲル粒子間空隙容積(void volume)

V_t :全カラム体積

V_e :ある物質の溶出体積

分子量の対数と K_{av} は、ある範囲で直線関係にある



2.クロマトグラフィー

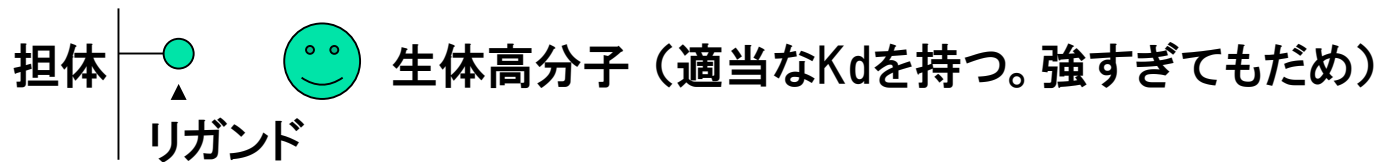
2-3 アフィニティークロマトグラフィー

生体物質と、他の生体物質との相互認識(特異的親和力)



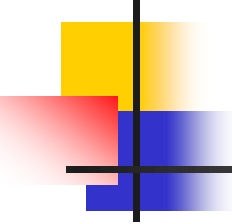
クロマトグラフィーに利用

リガンドを担体に固定(固定化)



リガンドとして、基質やエフェクター、阻害剤などが使われる。

- ・固定化は、特定の官能基の反応を利用
- ・生体高分子が結合・遊離できるリガンドを選択



2.クロマトグラフィー

2-4 疎水性クロマトグラフィー (HIC)

タンパク質→疎水性アミノ酸を含み、疎水性相互作用を形成



疎水性リガンドとタンパク質の疎水基の相互作用を応用

・移動相:親水性(硫酸アンモニウムなど)、固定相(ゲル):疎水性

疎水性相互作用に影響を及ぼす因子→温度、イオンなど

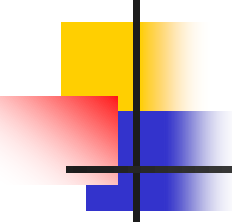
(イオンの影響)

水の溶媒構造を破壊(カオトロピックイオン)→疎水結合を弱める

SCN^- , I^- , NO_3^- , Ba^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} など

水の溶媒構造を安定化(アンチカオトロピックイオン)→疎水結合を強める

SO_4^{2-} , F^- , Cl^- , NH_4^+ , K^+ , Na^+



2.クロマトグラフィー

2-5 逆相HPLCによる分離(RPC)

タンパク質の疎水性相互作用を利用

固定相:疎水性(C18など)、担体も疎水性(シリカ)

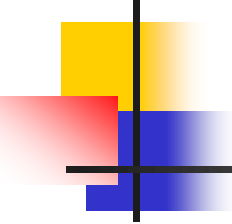
移動相:疎水性(アセトニトリルなど)

(特徴)

- ・両方とも疎水性なので、塩などを使用せずに分離ができる。
- ・イオン性物質の非特異的吸着を避けることが可能。
- ・塩を除去することもできる。



- ・タンパク質のみならず、ペプチドの分離にも有効
- ・分離能が高く、かつ回収率、再現性がよい。

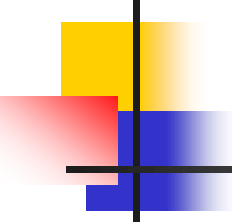


II. タンパク質の分析法(1)

何を分析するのか？

タンパク質の全体像をつかむ

1. 分子量の同定
 - 1-1 ゲルろ過
 - 1-2 超遠心法
 - 1-3 質量分析(MS)
 - 1-4 電気泳動
2. タンパク質の定量法
3. 分光学的解析
 - 3-1 吸収スペクトル
 - 3-2 CDスペクトル
 - 3-3 蛍光スペクトル
 - 3-4 赤外吸収スペクトル



1. 分子量の同定

1-1 ゲルろ過クロマトグラフィー

試料の溶出体積 V_e と分子量 M の対数は直線関係になる。

分子量既知のタンパク質の V_e を基に検量線を作成



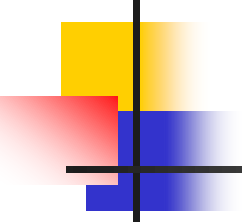
未知試料の V_e を求めることで分子量を算出する。

長所

- ・操作が簡便
- ・検出が容易
- ・解離、会合も容易に検出ができる

短所

- ・溶媒や担体の種類に左右される
- ・分子の半径(Stokes半径)による
- ・試料の濃度にも依存する場合がある。



1. 分子量の同定

1-2 超遠心法

タンパク質溶液 → ある溶媒中で数万g以上の遠心力を与える

遠心力 ↓



大
↓ 分子量
小

↓
回転中心から分子量に依存して(沈降)移動する

(沈降平衡法)

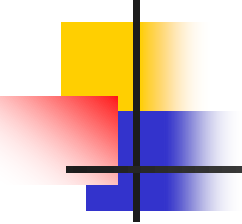
上記の超遠心で平衡に到達

↓
ローター中心からの距離 r^2 と吸光度の対数をプロット

↓
傾きを算出する

↙
$$M(1-\bar{v}\rho)\omega^2 / 2 RT \text{に等しい}$$

M:分子量、 $\bar{v}$:溶質の偏比容(=比重の逆数)、 ρ :溶媒の比重、
 ω :回転角速度(= $2\pi \times \text{回転数(rpm)}/60$), R:気体定数、T:絶対温度



1. 分子量の同定

1-3 質量分析(MS)

多くの方法はイオン化法 → サンプルをイオン化して検出

$M \rightarrow (M+H)^+$

1. 電場	(ESI, CI, FDなど)	
2. 粒子衝撃	(PD, FAB, SIMSなど)	
3. レーザー脱離	(MALDIなど)	→ 高分子用

検出法(イオンの分離)

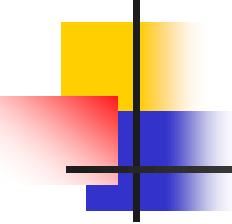
1. 磁場型	→ 低分子用(ペプチド、糖、脂質など)
2. 四重極型(Q-MS)	
3. 飛行時間型(TOF-MS)	高分子用(タンパク質)

実際には、イオン化法と検出法の組み合わせ

MALDI TOF-MS

(マトリクスアシステッドレーザーデソープションイオン化(MALDI)ー飛行時間型(TOF)MS)

m/z (質量/電荷)で質量を表す。



1. 分子量の同定

1-4 電気泳動

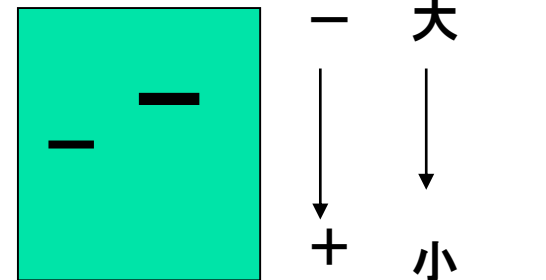
担体: ポリアクリルアミドゲルを使用
(ポリアクリルアミドゲル電気泳動; PAGE)

分子量の決定

SDS-PAGE

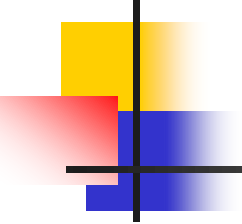
変性剤のSDSを用いてタンパク質を変性させる。

↓
電気をかける



↓
タンパク1分子あたりのSDSの結合数が決まっており、分子量に応じた電荷を持つ。
ポリペプチド鎖の分子量に従って泳動される。

↓
分子量既知の試料の泳動度(R_f)との対比で、未知試料の分子量を決定



2. タンパク質の定量法

比色定量法

ビウレット法	ペプチド-アルカリ銅(II)錯体（紫色）
フェノール試薬法(Lowry法)	ビウレット+Tyr, Trp, Cys (750nm)
ビシンコニン酸法	ビシンコニン酸-アルカリ銅(I)錯体(562nm)
色素結合法	クマシーブリリアントブルー(CBB)-タンパク質(595nm)

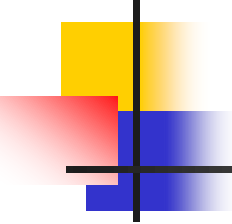
アミノ酸組成分析法

ポストカラム法

ニンヒドリン、OPA、フルオレサミンなど

プレカラム法

PITC、Dabsyl-Clなど

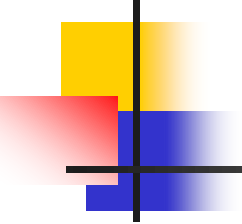


III. タンパク質の分析法(2)

タンパク質の全体像をつかむ

3. 分光学的解析

- 3-1 吸収スペクトル
- 3-2 CDスペクトル
- 3-3 蛍光スペクトル
- 3-4 赤外吸収スペクトル



第3回 タンパク質の分析法(2)

3. 分光学的解析

3-1 吸収スペクトル

物質はその官能基の種類により、特異的な波長の電磁波を吸収する。

- 吸光度Aは透過率Tと相関がある。 吸光度と光学密度(OD)は同義

$$A = \log I_0/I = 2 - \log T$$

$$T = I/I_0 \times 100$$

I_0 : 入射光の強さ、 I : 透過光の強さ

- Lambert-beerの法則

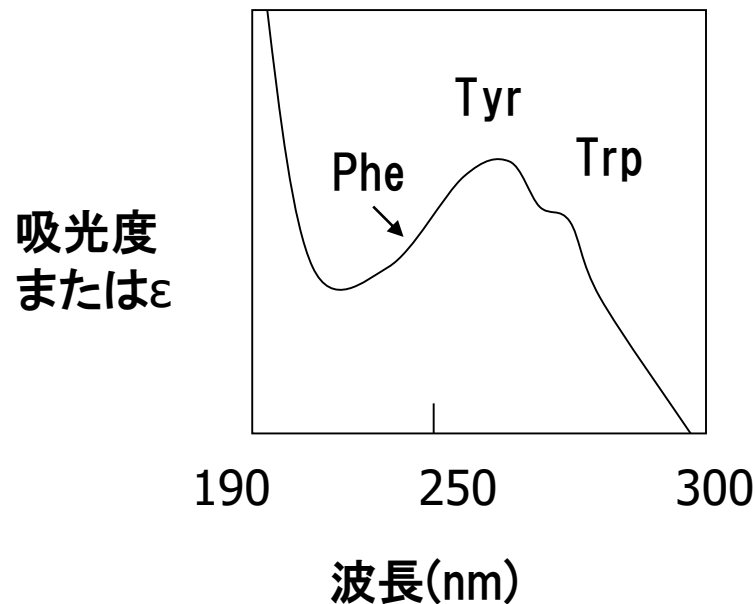
$$A = \epsilon c \ell$$

ϵ : モル吸光係数 (c はモル濃度、 ℓ はcm)、物質固有の値
 c : 濃度 (mol/l)
 ℓ : 光路長 (cm)

$$A = E_{1\%}^{1\text{cm}} c \ell$$

E : 吸光係数 (c は重量%、 ℓ はcm)、物質固有の値
 c : 濃度(重量%, w/v)
 ℓ : 光路長 (cm)

3-1 吸収スペクトル



一般的なタンパク質の紫外部
吸収スペクトル

紫外部

遠紫外部(190~240nm)
結合、官能基(直鎖)の吸収に由来

C=O, N-H. 205~230nm

近紫外部(240~320nm)
官能基(芳香環)の吸収に由来

Tyr 275~285nm

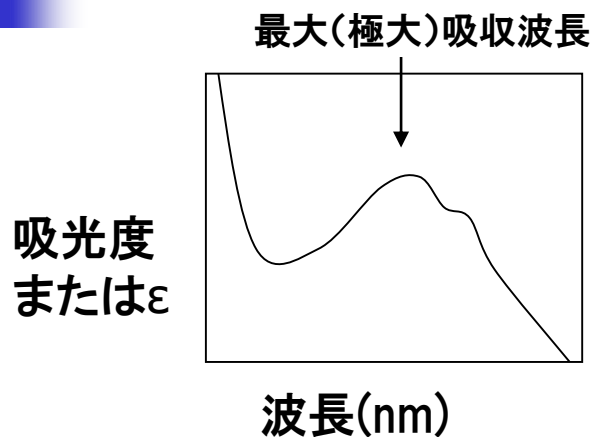
Trp 280~290nm

Phe 240~260nm

His 240~250nm

➤ 吸収弱い

3-1 吸収スペクトル



可視部 (300~800nm)

発色団(補欠分子族)

補酵素

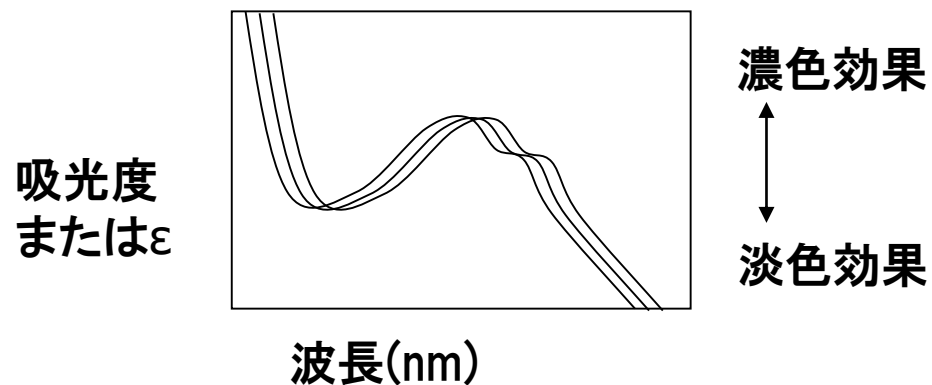
金属

錯体など

ヘム (405nm)

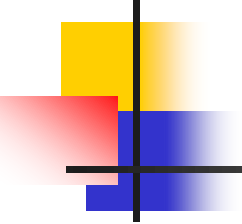
ピリドキサルリン酸 (320, 388nm)

青色シフト ← → 赤色シフト



補欠分子族に対する影響を検討
(pH, 温度、結合など)

検出感度は高くないが、
簡便で試料の回収も可能



3-2 CD(円偏光二色性)スペクトル

直線偏光 → 左右円偏光の合成



左右円偏光に対する屈折率に差のある物質
光学活性物質(不斉炭素を持つ物質)



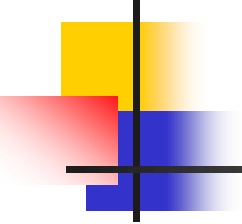
旋光性(左旋性、右旋性)を示す。
旋光度の波長依存性
(旋光分散,ORD)



左右円偏光に対する吸光係数の差異
(円偏光二色性)

$$\Delta \varepsilon = \varepsilon_L - \varepsilon_R$$

透過光も楕円偏光となる。
長軸と短軸の比を正接とする角度 θ を
楕円率という。



3-2 CD(円偏光二色性)スペクトル

遠紫外部(190~250nm) タンパク質の二次構造に由来

近紫外部(240~300nm) 芳香族側鎖に由来



構造既知のタンパク質の二次構造と、CDスペクトルには相関がみられる。
(経験的な側面もある)

長所

測定が簡便
精度が高い
低濃度で測定が可能
解釈が容易

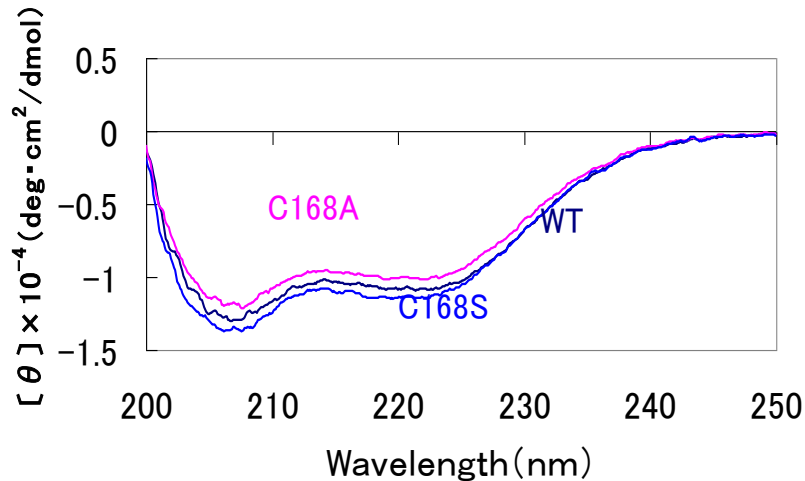
短所

機械が高価
二次構造含量(特にヘリックス)
の少ないタンパクには不向き
二次構造変化の測定に向いている。
詳細な構造解析はできない。

二次構造のクラス分けに有効

全 α タンパク、 α + β タンパク(α ヘリックスに富む領域と β シートに富む領域)、
 α / β タンパク(α ヘリックスと β シートが交互に存在)、全 β タンパク

3-2 CD(円偏光二色性)スペクトル



Tth. PPaseおよび各変異体の遠紫外部における
CDスペクトル

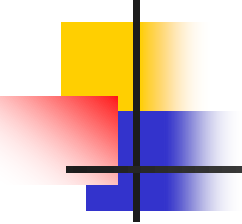
実際の例

222nmの θ (平均残基捲円率;
アミノ酸1残基あたりの捲円率)
から、 α -helix含量を見積もる。

$$\text{Helix(\%)} = \frac{-([\theta]_{222\text{nm}+2,340})}{30,300} \times 100$$

30,300: α -helix理論値

2340: 222nmにおける β -sheetと不規則構造
の理論値



3-3 蛍光スペクトル

基底状態から励起一重項状態へ → 吸収
励起一重項から基底状態へ → 蛍光

タンパク質の立体構造変化を知る手段→吸収より感度がよい(nM)

タンパク分子内の蛍光基→構造変化を知るための目印(プローブ)として利用

芳香族側鎖を持つアミノ酸→Trp, Tyrなどを利用

蛍光色素を導入

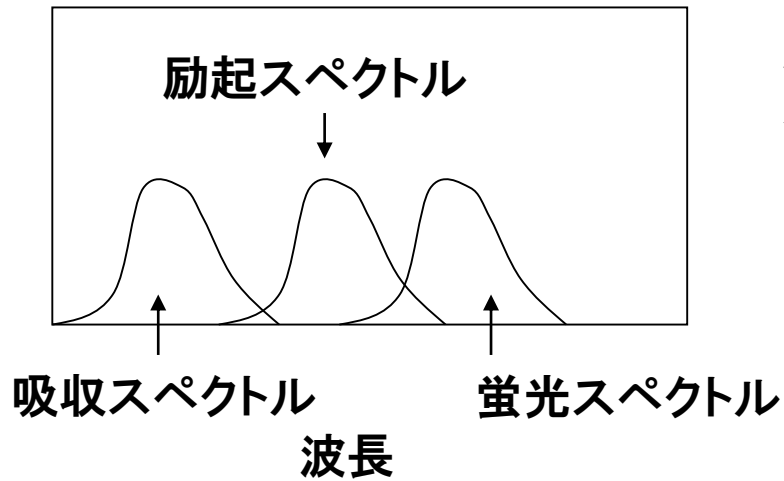
タンパク質の疎水基と結合,特定の官能基と結合など

蛍光スペクトルの種類

蛍光励起スペクトル→検出波長固定、励起波長のスペクトル

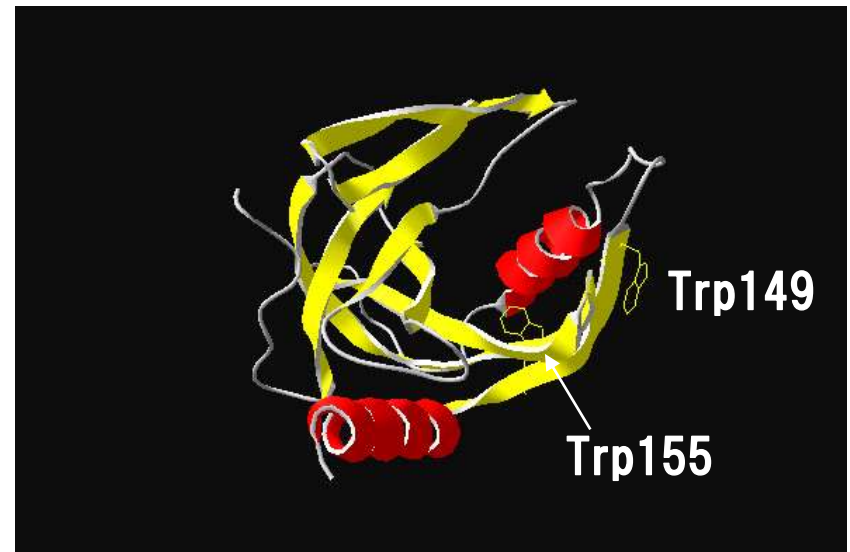
蛍光発光スペクトル→励起波長固定、検出波長のスペクトル

3-3 蛍光スペクトル

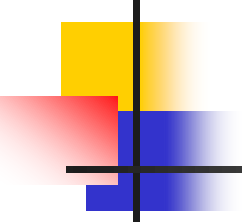


励起スペクトルより、蛍光スペクトルは長波長側に検出される

励起スペクトル: 蛍光基のエネルギー変化
蛍光スペクトル: 蛍光基の相互作用



Tth PPaseの三次元立体構造とTrpの位置



3-4 赤外吸収スペクトル

分子が光を吸収 → 電子が励起または分子が振動

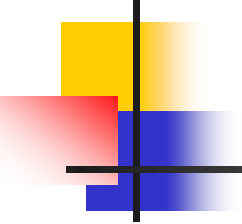
赤外吸収——分子振動を観察
単位(cm)あたりの電磁波の波の数 (波数、 cm^{-1})

タンパク質の場合には、主にペプチド結合の振動が検出
↓ 結合角、結合距離の影響
二次構造の検出に有効

赤外吸収の場合、水分子も振動するため、重水(D_2O)中で測定

測定は、高分子フィルムもしくはハロゲンセル(NaCl , KBr , CsBr)で行う。

安定性同位体などの併用により、反応追跡(同位体交換)などにも利用できる。



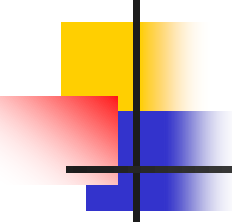
IV. タンパク質の構造解析法

1. X線構造解析

1-1 タンパク質の結晶化

1-2 立体構造決定

1-3 データベースの利用

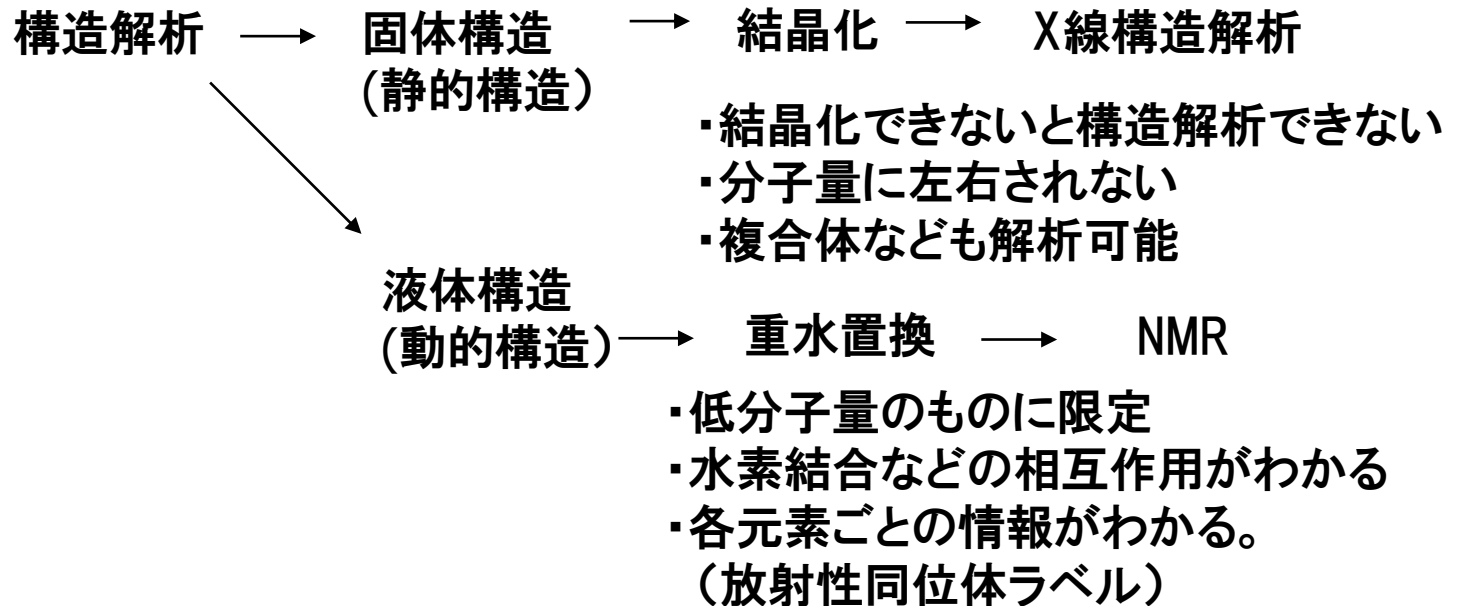


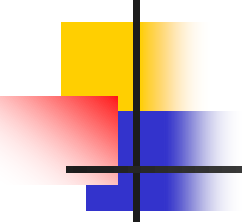
1. X線構造解析

タンパク質の立体構造決定



動的構造(NMR)か静的構造(X線結晶解析)か？





1. X線構造解析

1-1 タンパク質の結晶化

X線構造解析 → タンパク質を結晶化しなければならない

精製した試料



高濃度(10mg/ml以上)に濃縮、Total 100mg以上必要



タンパク質の結晶化法



結晶化条件の探索

1. 蒸気拡散法
2. 透析法
3. Seeding法

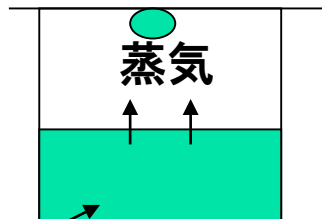
- タンパク濃度
- pH(緩衝液選択)
- 沈殿剤の種類、濃度
- 温度

1. X線構造解析

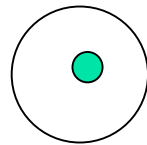
1-1 タンパク質の結晶化

1. 蒸気拡散法

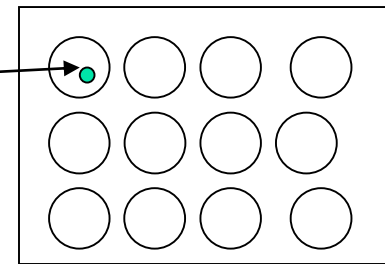
ハンギングドロップ法



外液(緩衝液+沈殿剤)

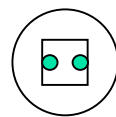
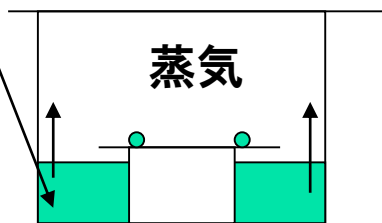


上から見た図

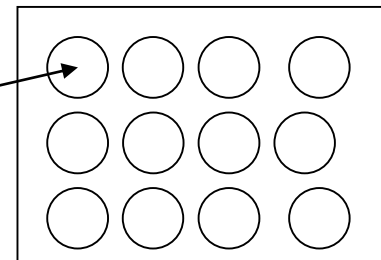


結晶がガラスに付着しにくい
偏光顕微鏡で直接観察できる

シットイングドロップ法



上から見た図



試料が少量でよい
体積に依存しない

1. X線構造解析

1-1 タンパク質の結晶化

2. 透析法

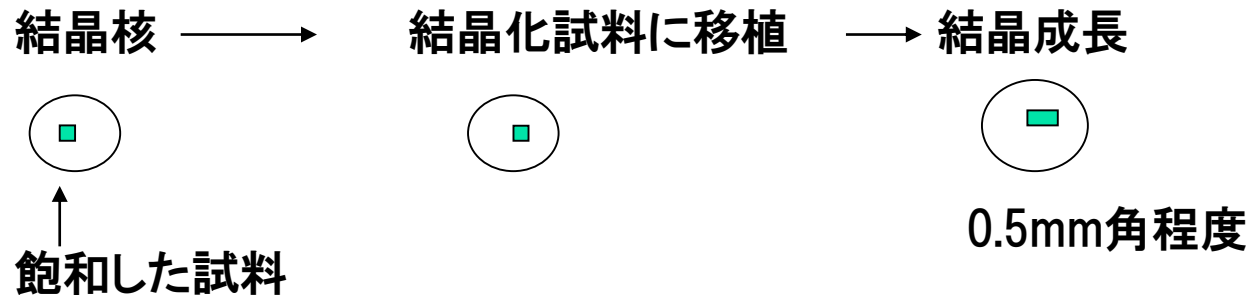
沈殿剤と試料を、液-液界面で拡散させる。

長所: 平衡に達する時間が短い

短所: 体積が増える→キャピラリーなどで改良

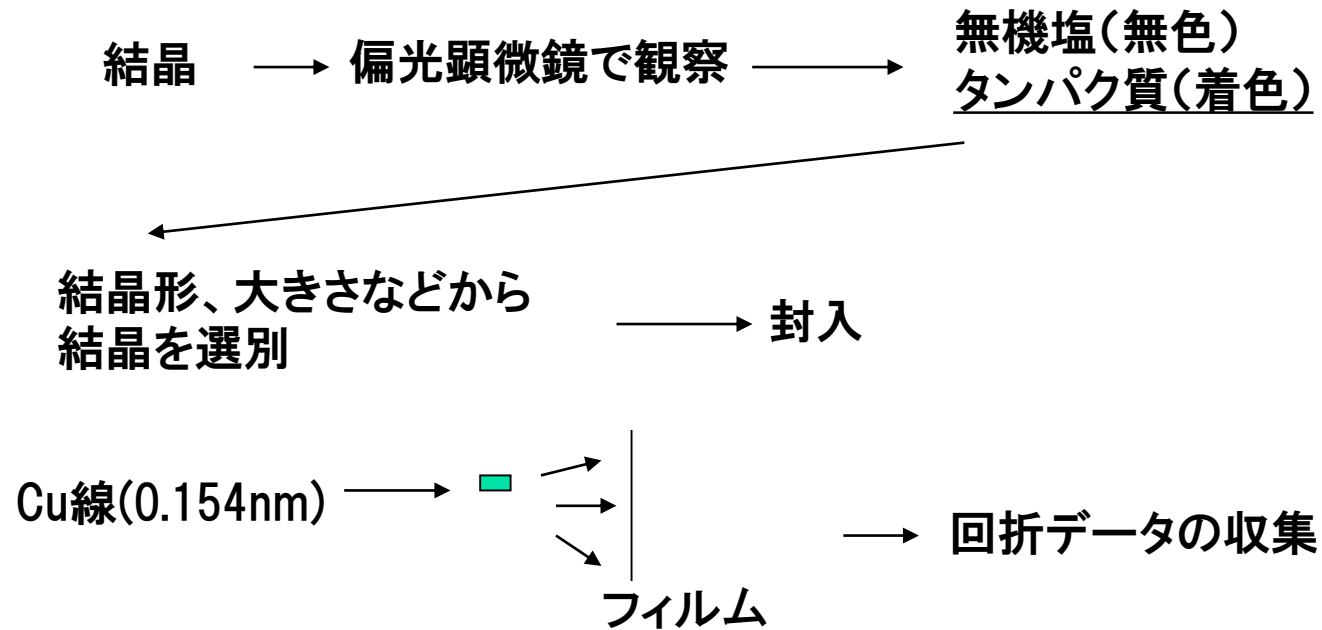
3. Seeding法

小さな結晶しか生成しない場合に有効

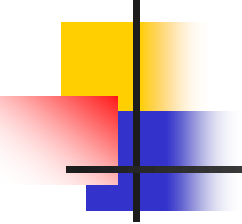


1. X線構造解析

1-2 立体構造決定

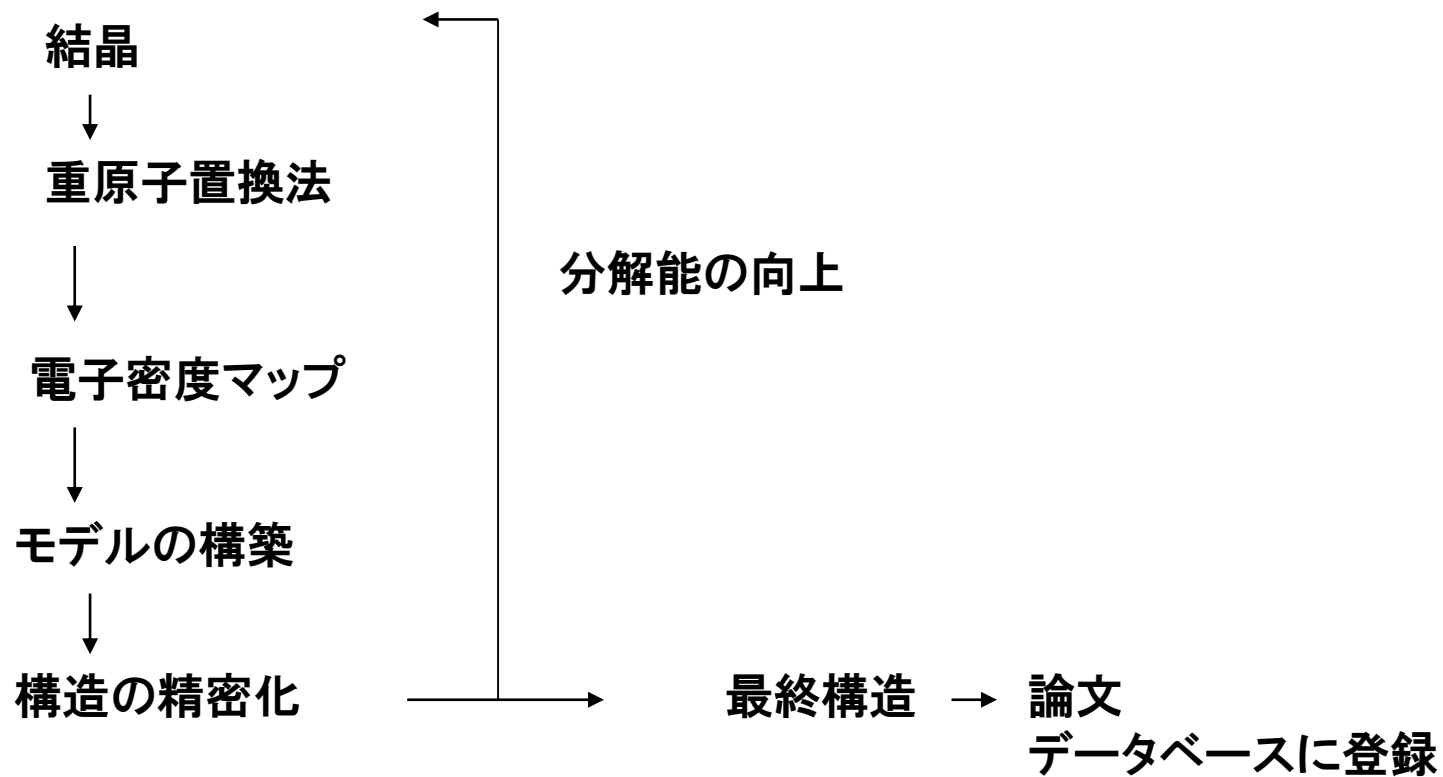


結晶の予備照射



1. X線構造解析

1-2 立体構造決定



1. X線構造解析

1-3 データベースの利用

Protein data bank (PDB)

タンパク質三次元立体構造のデータベース

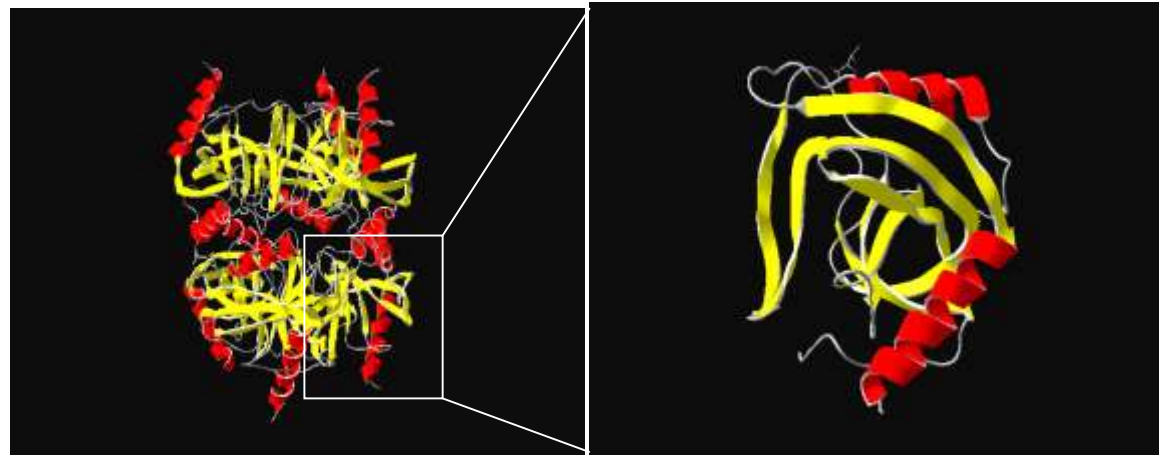
<http://pdb.protein.osaka-u.ac.jp/pdb/index.html>

PDB code :2PRD

↓
一つの構造に固有
のpdb code

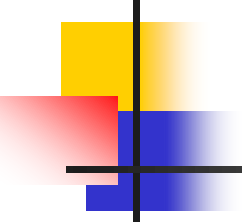
↓
既知の場合にはcodeで
downloadできる

わからない場合には
キーワードで検索



6量体

単量体



1. X線構造解析

1-3 データベースの利用

構造をダウンロード → 原子の座標データ



解析ソフトで図示、解析

解析ソフト

Swiss pdb viewer

<http://www.expasy.org/swissmod/SWISS-MODEL.html>

リボンモデル
空間充填モデル
スティックモデル



選択した主鎖、側鎖のみ表示
アミノ酸変異シュミレーション
原子間距離、結合角
二次構造情報