



アフィニティーキャピラリー電気泳動：
電気泳動による分子間相互作用の解析：
総合科学研究会講演スライド

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 福島県立医科大学総合科学教育研究センター 公開日: 2017-11-14 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 志村, 清仁 メールアドレス: 所属:
URL	https://fmu.repo.nii.ac.jp/records/2000693

アフィニティーキャピラリー電気泳動¹ ~ 電気泳動による分子間相互作用の解析 ~

志村 清仁 福島県立医科大学自然科学講座 (化学)

研究連携セミナー

2012年10月3日 4号館 第6講義室

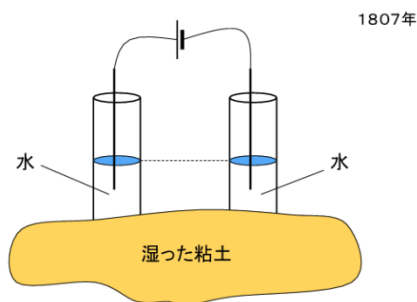
アフィニティーキャピラリー電気泳動
~ 電気泳動による分子間相互作用の解析 ~

自然科学講座(化学) 志村清仁

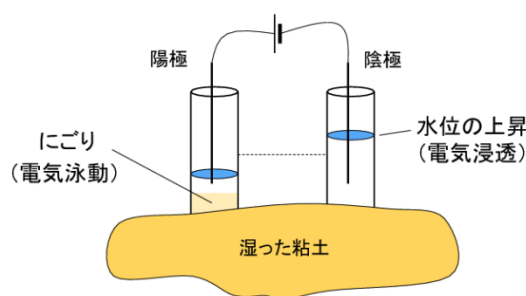
概要

キャピラリー電気泳動は、微量の試料で、精密かつ迅速に電気泳動分離を行うことができる。この方法はまた、生体分子間の結合平衡定数を決定する方法としても、たいへん優れている。本学にも共通機器として全自動キャピラリー電気泳動装置が導入された。本セミナーでは、本学のキャピラリー電気泳動装置を用いて行うことができる相互作用解析の方法を中心に解説する。

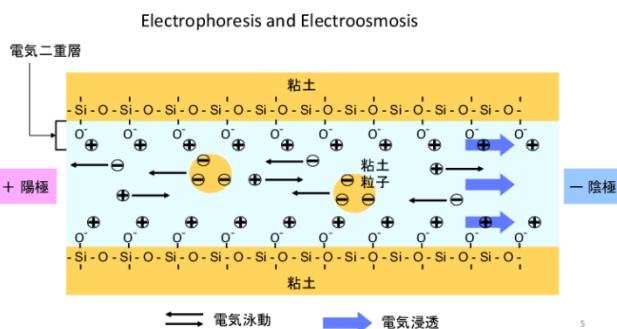
Reussの実験



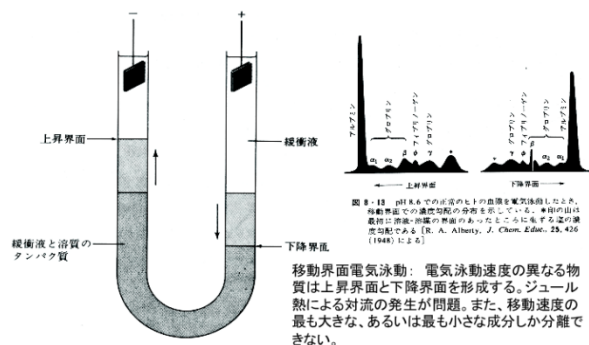
Reussの実験



電気泳動と電気浸透



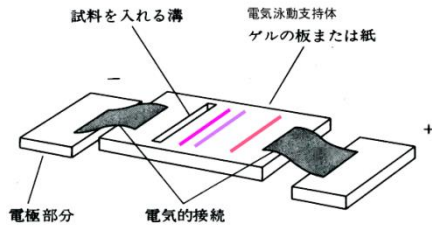
U字管電気泳動



移動界面電気泳動：電気泳動速度の異なる物質は上昇界面と下降界面を形成する。ジュール熱による対流の発生が問題。また、移動速度の最も大きな、あるいは最も小さな成分しか分離できない。

¹ 本稿は、「研究連携セミナー2012・第24回総合科学研究会（2012年10月3日）」に講演されたものである。

ゾーン電気泳動



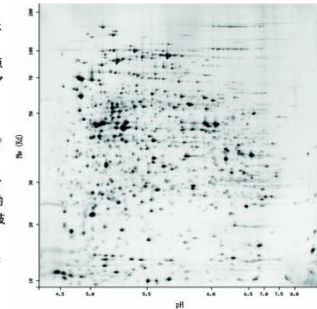
移動度の異なる成分を完全に分離できる。支持体(担体)が必要。

タンパク質の二次元ゲル電気泳動

一次元は pH 勾配の中で電気泳動を行う。タンパク質はそれぞれの等電点に集まって動かなくなる(焦点化)。二次元目は SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分子量によって分離する。

生物を構成するタンパク質全体(プロテオーム)の動きから生命現象を研究するプロテオミクスという研究分野が発展した。二次元ゲル電気泳動と質量分析計はこの分野の主要な技術である。

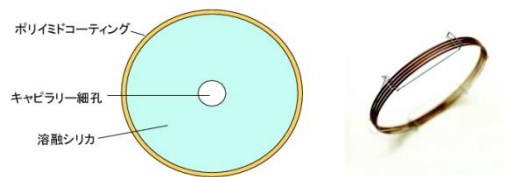
右図 大腸菌タンパク質の二次元ゲル電気泳動図



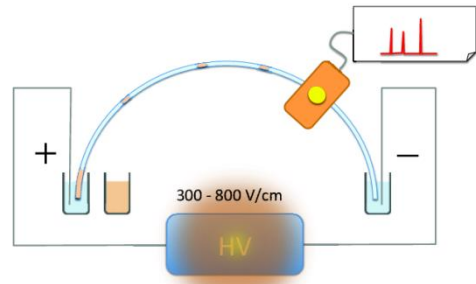
キャピラリー

キャピラリー: 熔融シリカ (fused silica)、外径 370 μm 、内径 25-100 μm

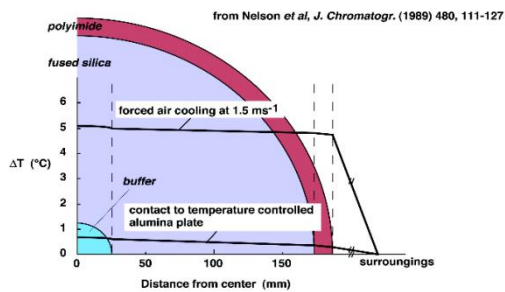
シリカは熱伝導率が高く、電気泳動で発生する熱を、表面積の大きな外壁に素早く伝えて放熱する。この高い放熱特性が、従来の電気泳動では不可能であった高電圧の使用を可能にし、高速かつ高分離を実現した。



キャピラリー電気泳動



キャピラリー内の温度



キャピラリー電気泳動のモード

Free Zone Electrophoresis: ただの電気泳動

MEKC: SDSミセルへの分配

Isoelectric Focusing: 等電点分離

Molecular Sieving: ポリマー溶液によるサイズ分離

検出

湾曲したキャピラリーは光学的検出に難点あり

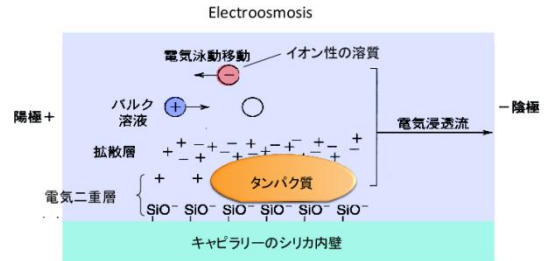
UV 吸収

- 光路長 50 μm (1 cm セルの 1/200)

レーザー励起蛍光 (488 nm, 532 nm)

- 10^{-10} M レベルの試料の検出は比較的容易
- 蛍光標識が必要

シリカへのタンパク質の吸着



内壁のコートニング

- タンパク質の吸着を抑制する。
- 電気浸透を低下させることも可能。

- 中性ポリマー: ポリジメチルアクリルアミド、アクリルアミド、メチルセルロース、ポリエチレングリコール)
- イオン性ポリマー: スクシニルポリリジン
- 中性界面活性剤: Tween 20

化学結合型 物理吸着型

泳動速度と移動度

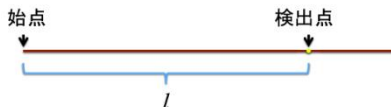
$$\mu = \frac{u}{E} = \frac{eZ}{6\pi r\eta}$$

- μ : 移動度
- u : 泳動速度
- E : 電場強度
- e : 単位電荷
- Z : 電荷の数
- r : 粒子の半径
- η : 粘度

移動度と検出時間

$$\mu = \frac{l}{E} \cdot \frac{1}{t}$$

- μ : 移動度
- l : 泳動距離
- E : 電場強度
- t : 検出時間



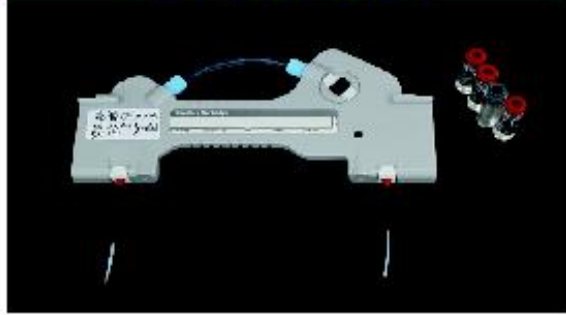
Beckman P/ACE MDQ



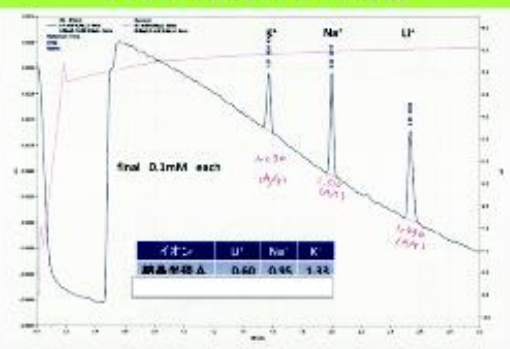
Beckman P/ACE MDQ



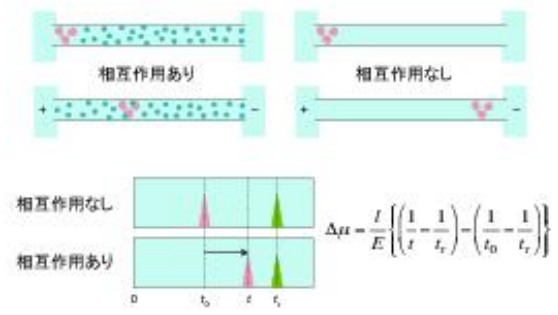
Beckman P/ACE MDQ



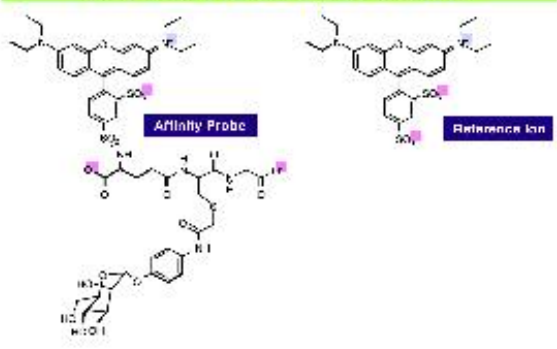
アルカリ金属イオンの分離



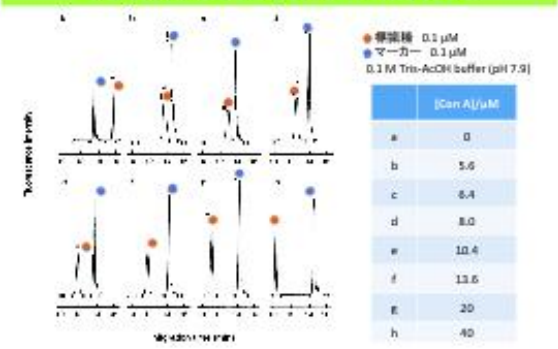
アフィニティーキャピラリー電気泳動 (ACE)



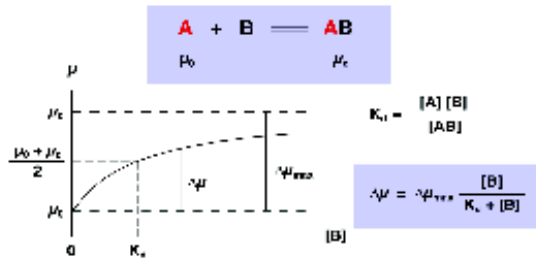
蛍光標識糖と Con A の相互作用



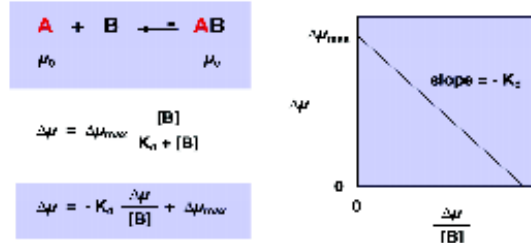
蛍光標識糖と Con A の相互作用



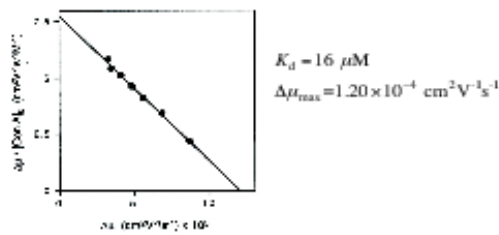
移動度の変化量の解析



直線プロットによる K_d の決定



直線プロットによる K_d の決定



中性糖 L と Con A の K_L の決定

標準糖と Con A の K_d が決定されると、定に移動度から Con A の濃度が決定できる。

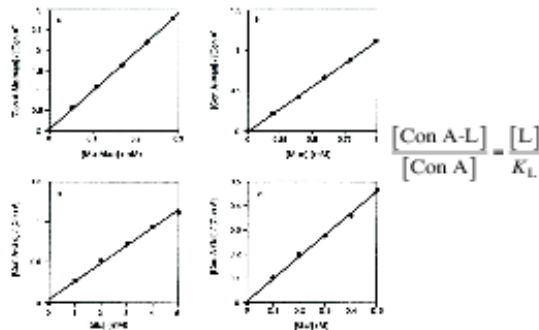
$$\Delta\mu = -K_L \frac{\Delta\mu}{[B]} + \Delta\mu_{max}$$



中性糖 L と Con A 存在下での標準糖の移動度を測定すると、混合物中の遊離の Con A の濃度を決定できる。

$$K_L = \frac{[\text{Con A}][\text{L}]}{[\text{Con A-L}]}$$

中性糖 L と Con A の K_L の決定



中性糖 L と Con A の K_L の決定

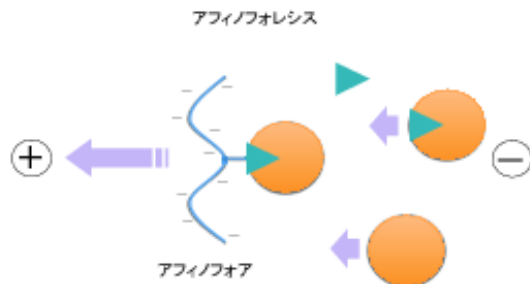
Comparison of K_L s with Literature Values

	AFCE	Affinity chromatography
Methyl- α -D-mannopyranoside	0.106 mM	0.047 mM ^a (0.182 mM ^b)
D-Mannose	0.80 mM	0.2 mM ^a (0.66 mM ^b)
D-Glucose	4.5 mM	1.6 mM ^a (4.5 mM ^b)
D-Galactose	1.1 mM	0.26 mM ^a (0.73 mM ^b)

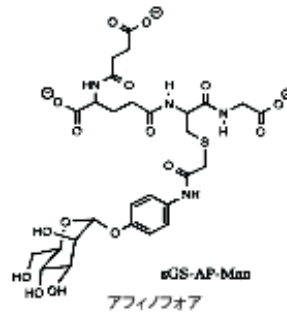
^a pH 7.9, 5°C (16).

^b Estimated values for 25°C by using $\Delta H^\circ = -34.7 \text{ kJ mol}^{-1}$ for the binding reaction of Con A to β -D-glucoside-immobilized Sepharose (16).

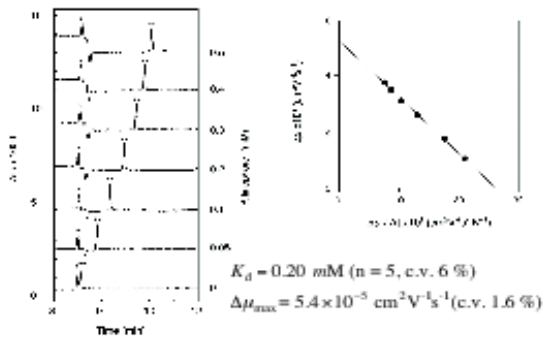
荷電担体に結合したリガンドを用いる方法



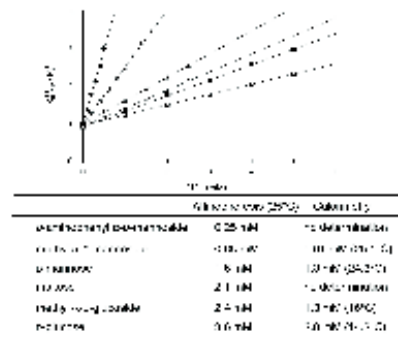
エンドウマメレクチンのアフィノフォア



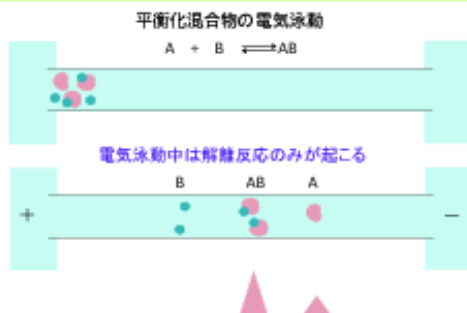
荷電担体に結合したリガンドを用いる方法



荷電担体に結合したリガンドを用いる方法

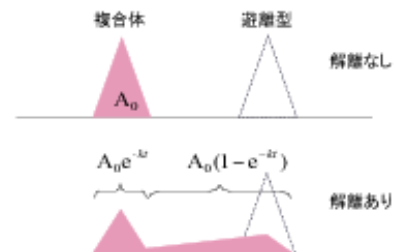


解離反応の遅い系の解析

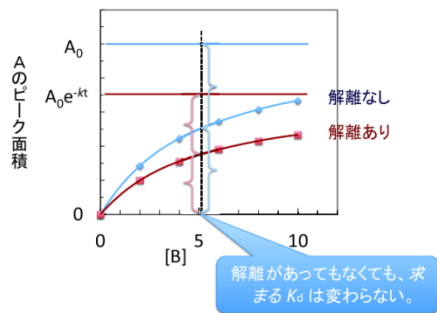


解離反応の遅い系の解析

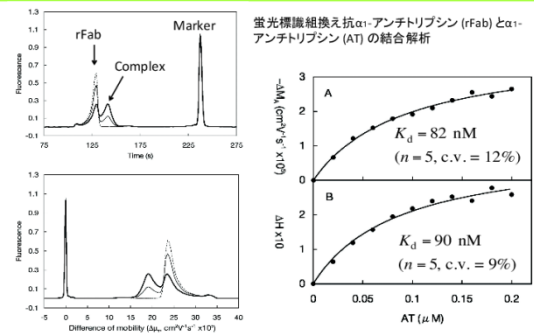
仮に開始時にはほとんどすべてが複合体を形成していても、分離時に解離が起こることは避けられない。



解離反応の遅い系の解析



解離反応の遅い系の解析



まとめ

- アフィニティー CE はタンパク質の結合平衡を微量試料で解析することができる。
- 蛍光標識を用いることにより、さらに測定の可能性が広がる。
- 熔融シリカキャピラリーを用いる場合には、内壁に簡単なコーティングを施すことにより、タンパク質の吸着を効果的に抑制できる。
- タンパク質相互作用ネットワークの解析や、タンパク質相互作用に介入する医薬のスクリーニングなどに、今後大きな貢献が期待できる。