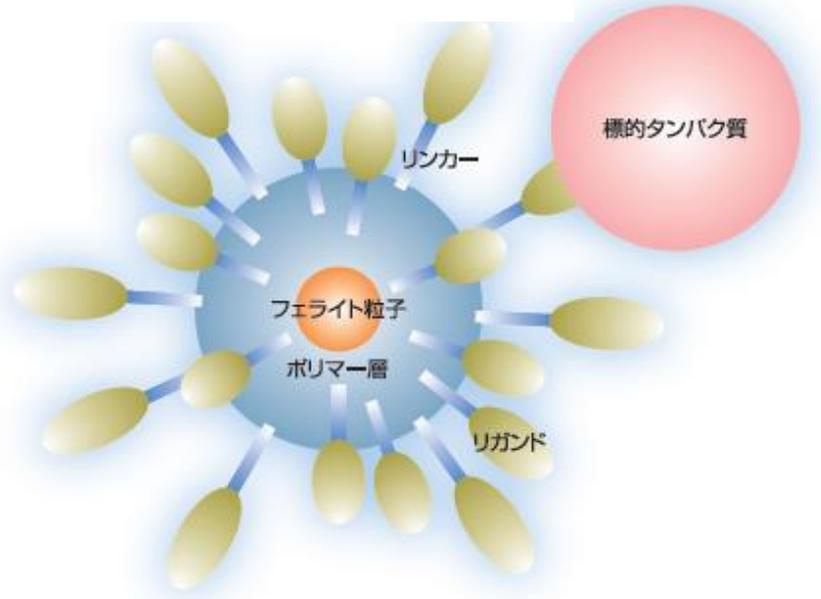
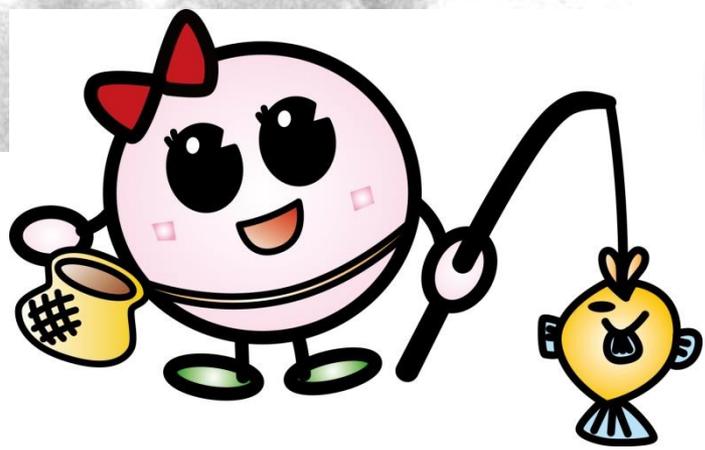


# タンパク質精製実験の流れ



多摩川精機株式会社

# 目次

リガンドの設計・構造活性相関	4
リガンド固定化量の検討	9
結合・洗浄bufferの組成検討	14
結合反応時間の検討	17
特異性の検討（競合阻害・ドラッグエリ्यूション）	18
アフィニティ精製の注意事項	23

# 標的タンパク質精製実験の流れ&ポイント

## ① リガンドの固定化

- ↓
  - ・ **リガンド固定化量定量 (HPLC)** **対照化合物**
  - ・ **リガンド固定化量の検討**

・ **リガンドの設計・構造活性相関**



## ② リガンド固定化ビーズとタンパク質溶液を混合 (細胞破碎液など)

- ・ 事前に遠心分離
- ・ 細胞抽出液の調製方法 (プロトコール401, 402)

## ③ 結合反応・洗浄・溶出 (塩溶出、ボイル溶出)

- ↓
  - ・ ビーズの分散 (ガリガリ法)
  - ・ 磁気分離

・ **結合・洗浄bufferの組成検討**

**結合反応時間**

・ **特異性の検討**

**(競合阻害実験、ドラッグエリユーション)**

・ **アフィニティ精製の注意事項**

**(ケラチンのコンタミに注意)**

## ④ 解析

**SDS-PAGE、銀染色、MS質量分析**

# 標的タンパク質精製実験の流れ&ポイント

## ① リガンドの固定化

- ↓ ・ リガンド固定化量定量 (HPLC)
- ・ リガンド固定化量の検討

- ・ リガンドの設計・構造活性相関  
対照化合物



## ② リガンド固定化ビーズとタンパク質溶液を混合 (細胞破碎液など)

- ・ 事前に遠心分離
- ・ 細胞抽出液の調製方法 (プロトコール401, 402)

## ③ 結合反応・洗浄・溶出 (塩溶出、ボイル溶出)

- ↓ ・ ビーズの分散 (ガリガリ法)
- ・ 磁気分離

- ・ 結合・洗浄bufferの組成検討  
結合反応時間

- ・ 特異性の検討  
(競合阻害実験、ドラッグエリユーション)

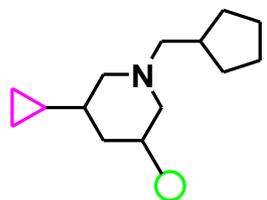
- ・ アフィニティ精製の注意事項  
(ケラチンのコンタミに注意)

## ④ 解析

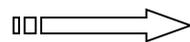
SDS-PAGE、銀染色、MS質量分析

# リガンドの設計・構造活性相関

## ① どの部分が活性に重要か（構造活性相関）を調べる



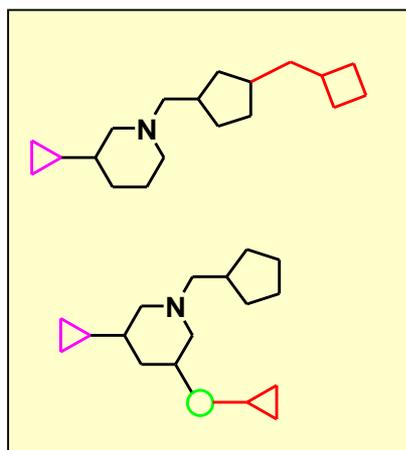
同薬効化合物のリストアップ  
構造活性相関調査



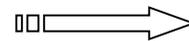
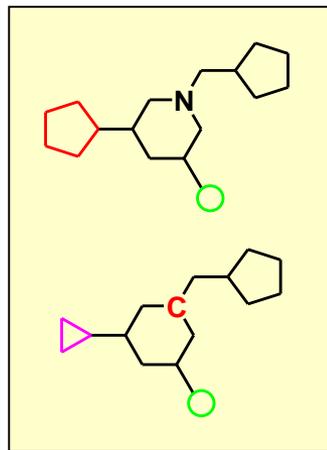
ファーマコフォア予測

類似構造、共通構造から、**標的タンパク質との相互作用に対して重要な部分構造・官能基**と影響を与えにくい部分を予想する

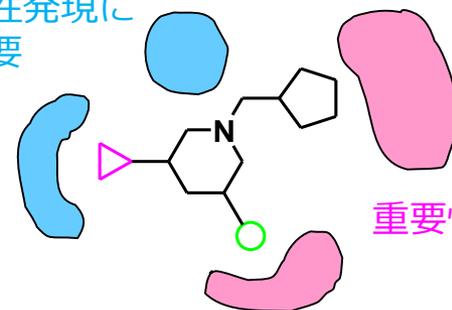
活性維持



活性低下



活性発現に  
重要

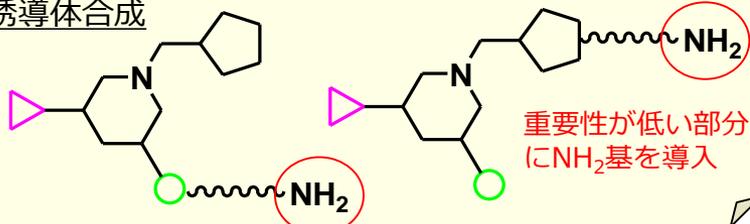


重要性低

## ② 活性発現に重要でない部分でビーズへ固定化する

活性に重要な部分でビーズへ固定化するとリガンドが活性を失い、標的タンパク質は精製できません。固定化するのに有効な官能基を持たない場合は、固定化用の誘導体を合成します。

固定化用誘導体合成



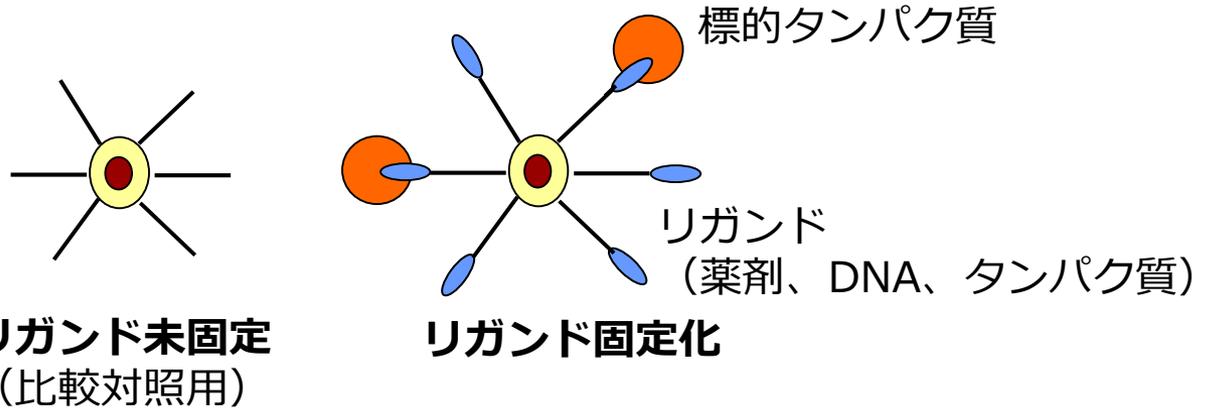
固定化する官能基の選択（反応性の観点より）

NH<sub>2</sub>基 > アルキン・アジド > ビオチン

# リガンドが準備できた後の流れ

## リガンドの固定化

リガンド未固定のビーズも準備する



リガンド固定化ビーズと  
タンパク質溶液を混合

結合反応・洗浄・溶出



質量分析 (結合タンパク質同定)

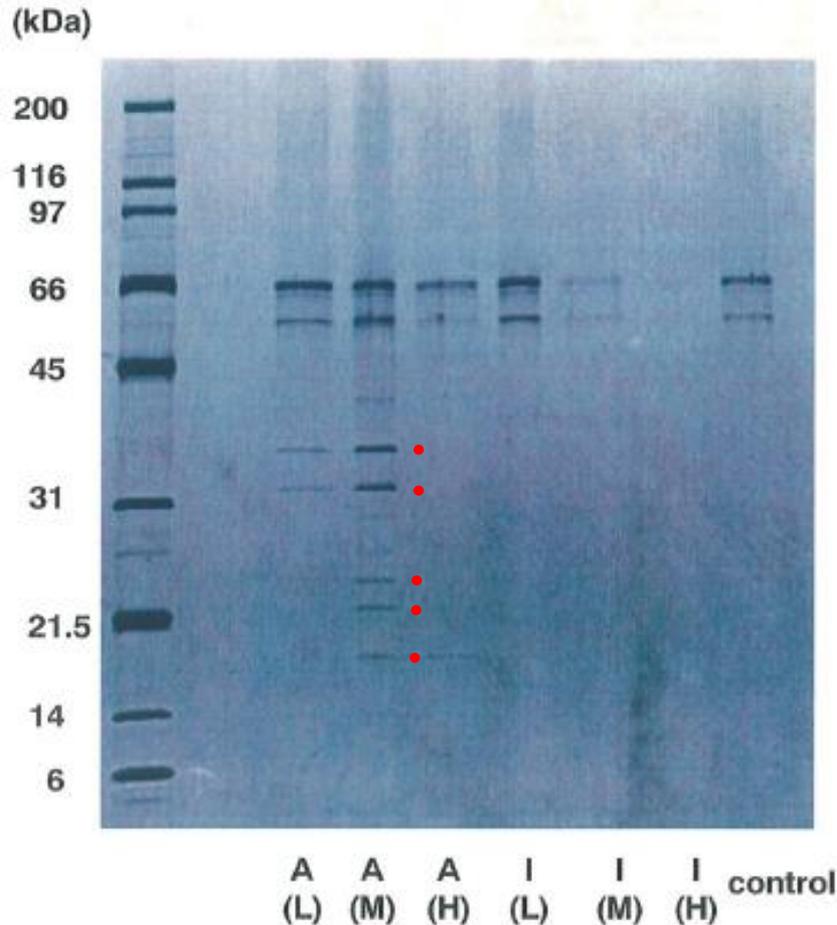
### 結合特異性解析

組換えタンパク質の調製  
結合ドメインの解析

### 機能解析

薬効との関連からタンパク質の機能を解析  
(生化学的・細胞生物学的実験)

# 標的タンパク質精製の実施例



タンパク質濃度 : 1 mg/ml

タンパク質量 : 250  $\mu$ g

20~40kDa付近に、活性がある化合物特異的と思われる結合タンパク質のバンドが複数あります。(赤丸)

➡ 対照化合物があると標的タンパク質が探索しやすくなります。

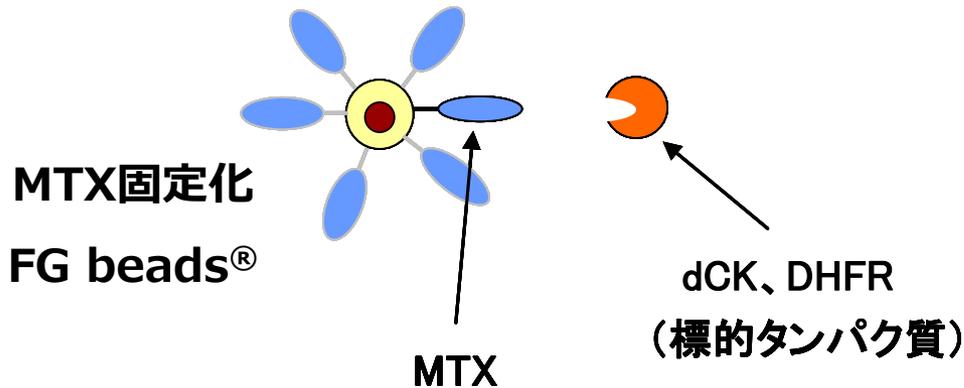
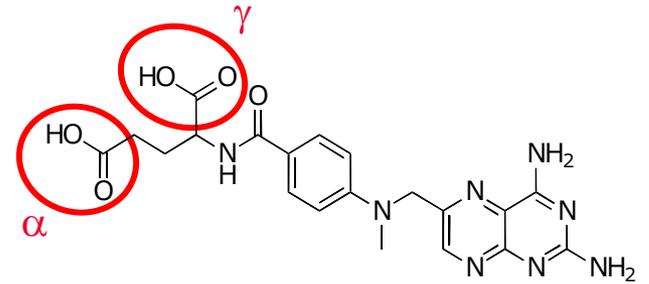
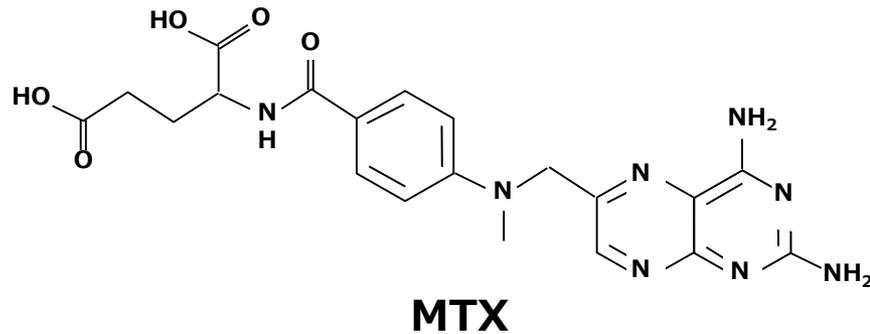
※ A:活性がある化合物

I:活性がない化合物

(L)(M)(H):化合物の固定化量Low/Medium/High

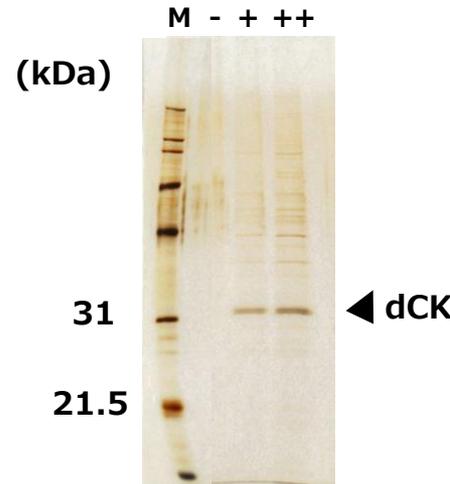
control:化合物固定化無し

# 固定化部位の違いによる精製タンパク質の違い



$\gamma$ 位で固定化

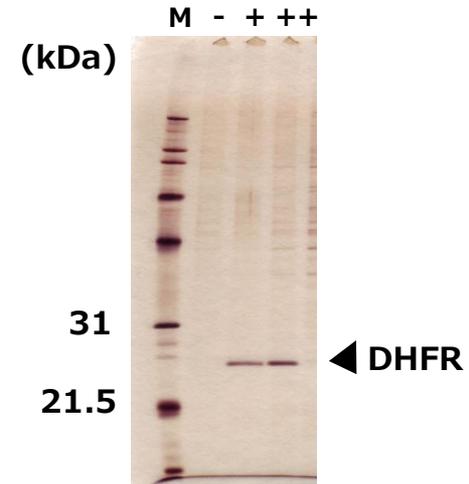
MTX仕込濃度



OH beads 使用

$\alpha$ 位で固定化

MTX誘導体\*仕込濃度



NHS beads 使用

\* $\alpha$ 位で固定化するために誘導体を使用

# 標的タンパク質精製実験の流れ&ポイント

## ① リガンドの固定化

- ↓
  - ・ **リガンド固定化量定量 (HPLC)**
  - ・ **リガンド固定化量の検討**

- ・ リガンドの設計・構造活性相関  
対照化合物



## ② リガンド固定化ビーズとタンパク質溶液を混合 (細胞破碎液など)

- ・ 事前に遠心分離
- ・ 細胞抽出液の調製方法 (プロトコール401, 402)

## ③ 結合反応・洗浄・溶出 (塩溶出、ボイル溶出)

- ↓
  - ・ ビーズの分散 (ガリガリ法)
  - ・ 磁気分離

- ・ 結合・洗浄bufferの組成検討

結合反応時間

- ・ 特異性の検討

(競合阻害実験、ドラッグエリユーション)

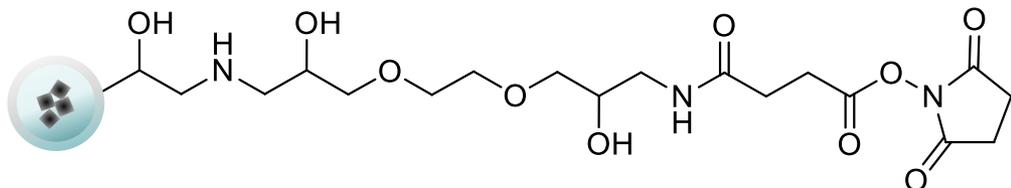
- ・ アフィニティ精製の注意事項

(ケラチンのコンタミに注意)

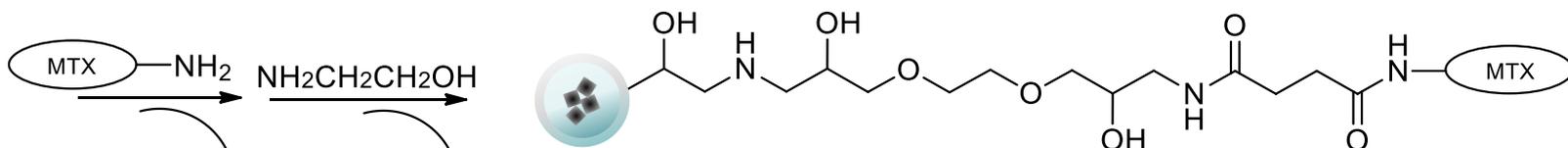
## ④ 解析

SDS-PAGE、銀染色、MS質量分析

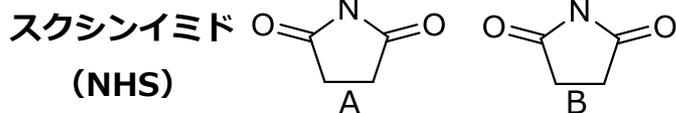
# HPLCによるMTX固定化量とビーズ表面のNHSの定量



NHS beads



MTXアミノ化誘導体



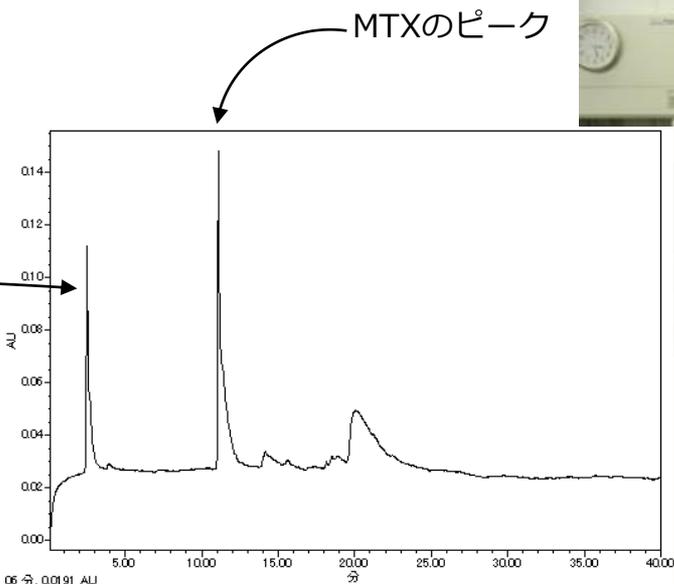
スクシンイミドのピーク

**固定化量が定量可能**

固定化されたMTXと同量のNHSが交換反応により反応上清中に遊離 (NHS A)

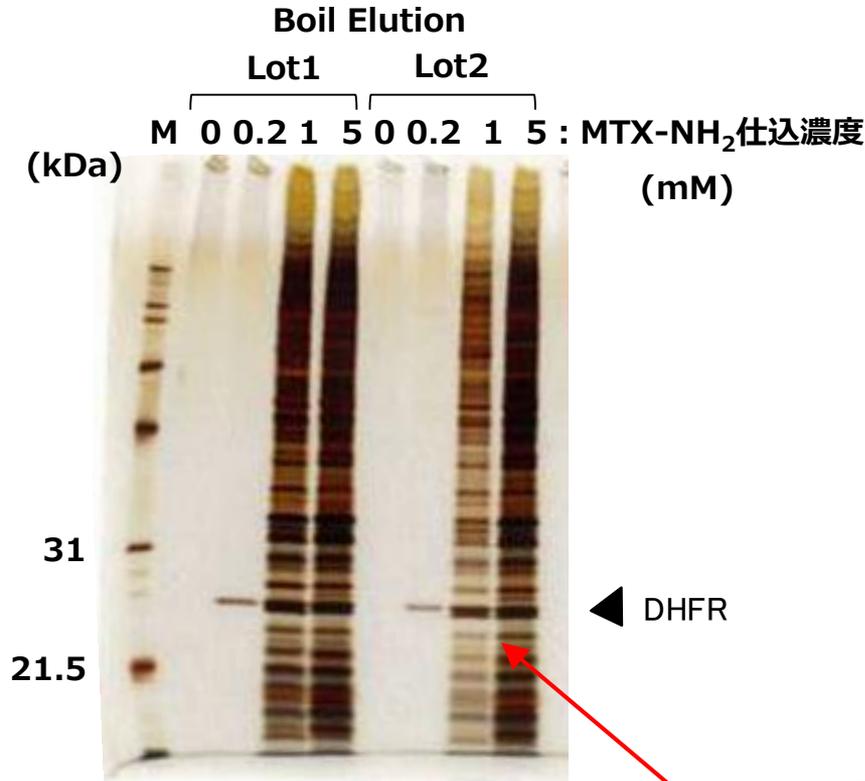
マスキングされたアミノエタノールと同量のNHSが交換反応によりマスキング上清中に遊離 (NHS B)

MTX固定化量 (NHS A) + マスキング量 (NHS B)  
= 官能基 (NHS) 量

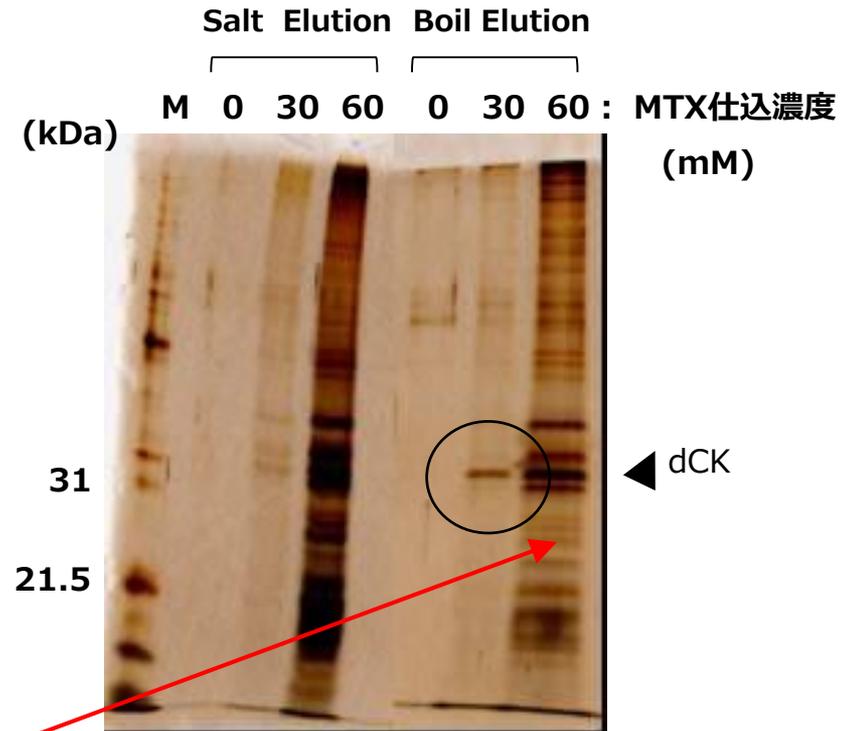


# リガンド固定化量最適化の必要性

## ①COOH beads (NHS化して使用)



## ②OH beads使用



**リガンド固定化量が多すぎると非特異的なタンパク質の吸着が多くなる！**

アフィニティ精製 : プロトコール001参照  
ビーズ量 : 0.5mg/1条件  
タンパク質溶液 : ①3 mg/ml, 200  $\mu$ l ②1 mg/ml, 200  $\mu$ l  
タンパク質の種類 : HeLa細胞質画分  
結合反応時間 : 2時間

# リガンド固定化量の検討

## フェノール性OH基を有する化合物の固定化 (プロトコール 003)

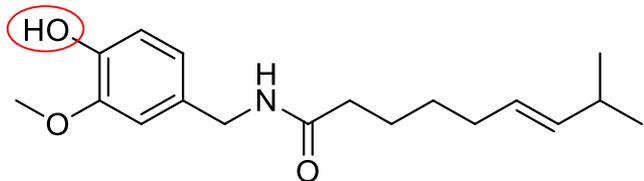
Linker beads 2.5mg (×4)  
 化合物 0 mM (DMF 500 μl)  
 2 mM (50 mM 20 μl + DMF 480μl)  
 10 mM (50 mM 100 μl + DMF 400μl)  
 50 mM (50 mM 500 μl)  
 炭酸カリウム 化合物の10倍モル

60°C, 24h

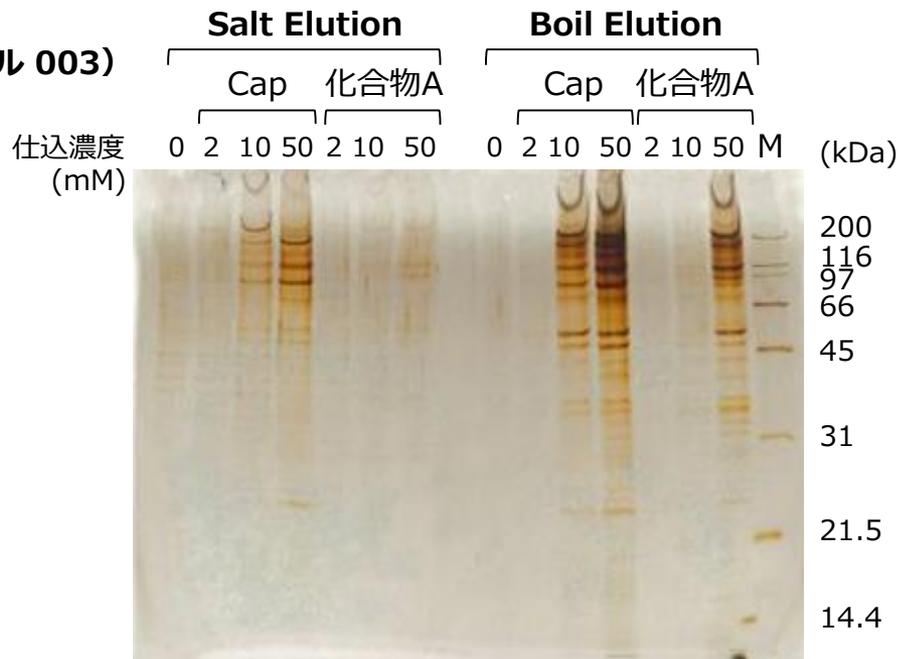
化合物固定化ビーズ

アフィニティ精製 (スクリーニング)

(プロトコール 001)



カプサイシン



条件

ビーズ : カプサイシン固定化ビーズ  
 化合物A固定化ビーズ

固定化濃度 : 0, 2, 10, 50 mM

ビーズ量 : 0.5 mg

結合・洗浄Buffer : 100 mM KCl buffer (200 μl)

溶出Buffer : ①1M KCl buffer (30 μl) (Salt Elution)  
 ②サンプルバッファー (40 μl) (Boil Elution)

タンパク質 : HeLa 細胞質画分

タンパク質濃度 : 3 mg/ml (200 μl)

反応時間 : 4 時間

リガンドが疎水性の化合物の場合、リガンドの仕込濃度を増やすにつれてタンパク質が疎水的、非特異的に吸着しタンパク質の結合量が増加します。このようなタンパク質の結合量の増加が見られれば、リガンドがビーズへ固定化されたと判断できます。

# リガンド固定化量の検討

## COOH基を有する化合物の固定化 (プロトコール005)

化合物	7 $\mu$ mol
スクシンイミド	7 $\mu$ mol
EDC	7 $\mu$ mol (Final 10mM)

2 h 0.7ml (DMF)

NH <sub>2</sub> beads	2.5mg (×4)
活性化化合物	
0 mM	(DMF 500 $\mu$ l)
0.4 mM	(10 mM 20 $\mu$ l + DMF 480 $\mu$ l)
2 mM	(10 mM 100 $\mu$ l + DMF 400 $\mu$ l)
10 mM	(10 mM 500 $\mu$ l)

Over night 500  $\mu$ l (DMF)

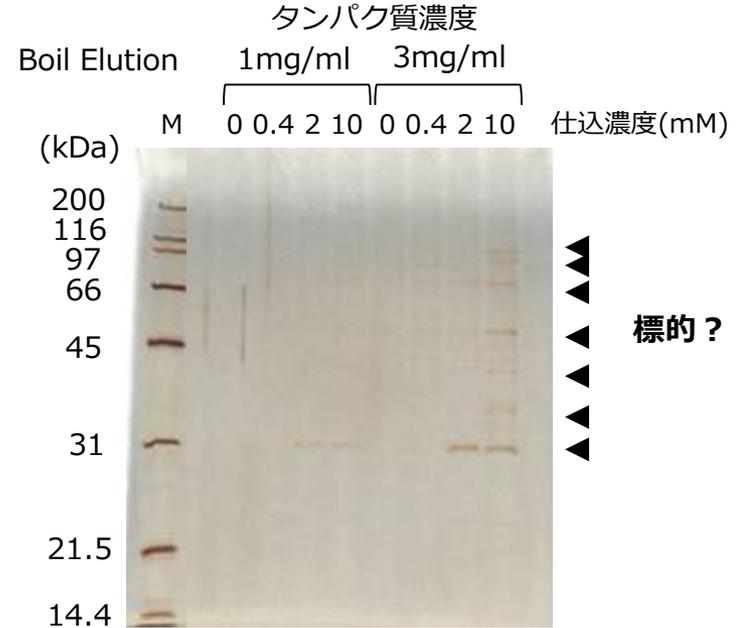
### マスキング

トリエチルアミン※1	50 $\mu$ l
無水酢酸	20 $\mu$ l

2 h 500  $\mu$ l (DMF)

### 化合物固定化ビーズ

アフィニティ精製 (スクリーニング)
(プロトコール 001)



条件	
ビーズ	: NH <sub>2</sub> ビーズ(S250PSSNENH2)
ビーズ量	: 0.5 mg
結合・洗浄Buffer	: 100 mM KCl buffer (200 $\mu$ l)
溶出Buffer	: ①1M KCl buffer (30 $\mu$ l) ②サンプルバッファー(40 $\mu$ l) (Boil Elution)
タンパク質	: HeLa細胞質画分
タンパク質濃度	: 1 mg/ml, 3 mg/ml (200 $\mu$ l)
反応時間	: 4 時間

リガンド仕込濃度2, 10 mMで結合タンパク質が精製されましたが、精製されたタンパク質の量が少ないことが分かります。タンパク質溶液中に標的となるタンパク質の存在量が少ない場合、リガンドがビーズへ固定化されていても、アフィニティ精製による標的タンパク質の精製量が少なく、タンパク質の同定や評価には不十分です。この場合はタンパク質溶液の濃度や液量を増やす検討が必要となります。

※1) 現在のプロトコールではトリエチルアミンは添加しない

# 標的タンパク質精製実験の流れ&ポイント

## ① リガンドの固定化

- ↓ ・ リガンド固定化量定量 (HPLC)
- ・ リガンド固定化量の検討

- ・ リガンドの設計・構造活性相関
- ・ 対照化合物



## ② リガンド固定化ビーズとタンパク質溶液を混合 (細胞破碎液など)

- ・ 事前に遠心分離
- ・ 細胞抽出液の調製方法 (プロトコール401, 402)

## ③ 結合反応・洗浄・溶出 (塩溶出、ボイル溶出)

- ↓ ・ ビーズの分散 (ガリガリ法)
- ・ 磁気分離

- ・ **結合・洗浄bufferの組成検討**
- ・ **結合反応時間**

- ・ 特異性の検討
- ・ (競合阻害実験、ドラッグエリユーション)

- ・ アフィニティ精製の注意事項  
(ケラチンのコンタミに注意)

## ④ 解析

SDS-PAGE、銀染色、MS質量分析

# カプサイシン標的タンパク質の精製-条件検討1

【1回目の検討】

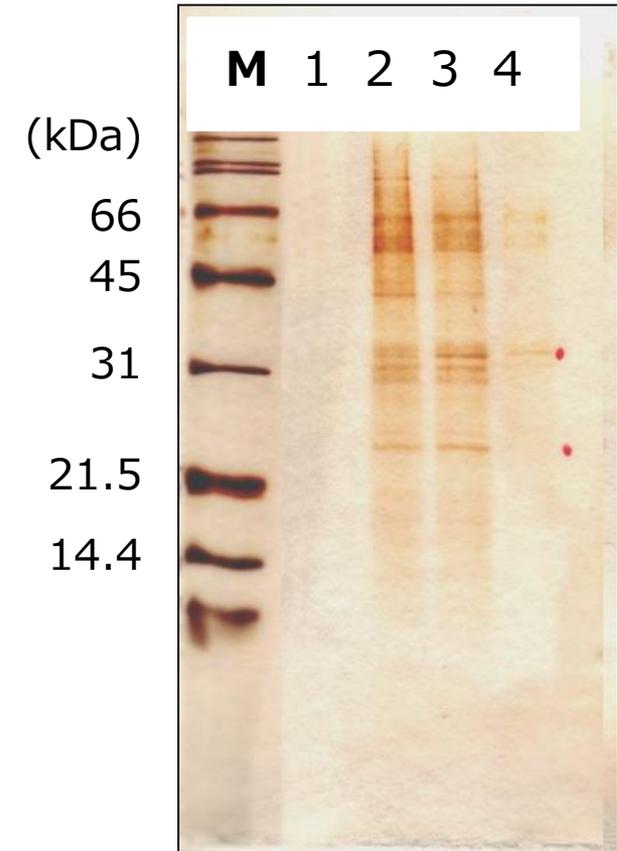
○仕込濃度を4点振り、FG beads<sup>®</sup>にカプサイシンを固定化

	1	2	3	4
Conc. (mM)	0	0.19	0.38	0.75
Et <sub>3</sub> N (μl)	0	2	2	2

○アフィニティ精製を実施

精製条件

- Beads : 0.5 mg
- 結合・洗浄buffer : **50 mM KCl**
- Lysate : NB4 細胞質 1 mg/ml  
(500μl)



結合タンパク質のバンドパターンから、Lane 1とLane 2の間に最適なカプサイシンの仕込濃度があると考え、2回目の検討に進みました。

# カプサイシン標的タンパク質の精製-条件検討2

【2回目の検討】

○仕込濃度を4点振り直し、再度カプサイシンを固定化

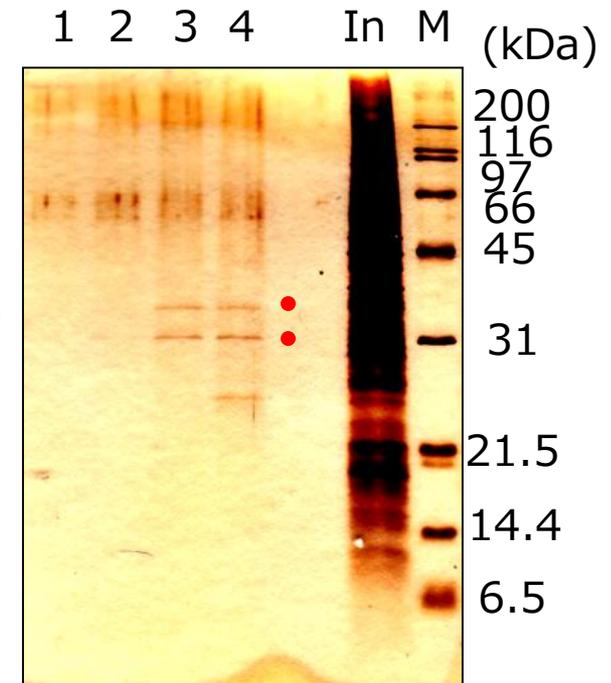
	1	2	3	4
Conc. (mM)	0	0.05	0.10	0.20
Et <sub>3</sub> N (μl)	0	2	2	2

○アフィニティ精製を実施

精製条件

- Beads : 0.5mg
- 結合・洗浄buffer : **150 mM KCl**
- Lysate : NB4 cyto. 1 mg/ml  
(500μl)

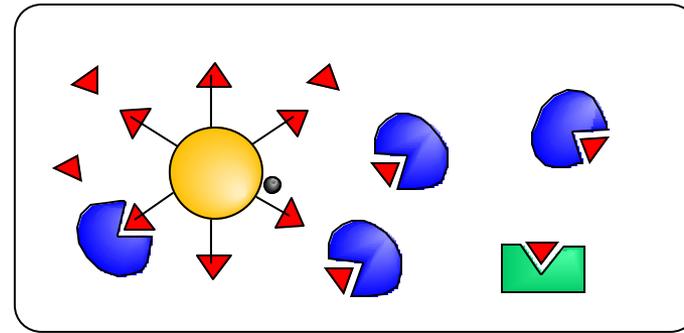
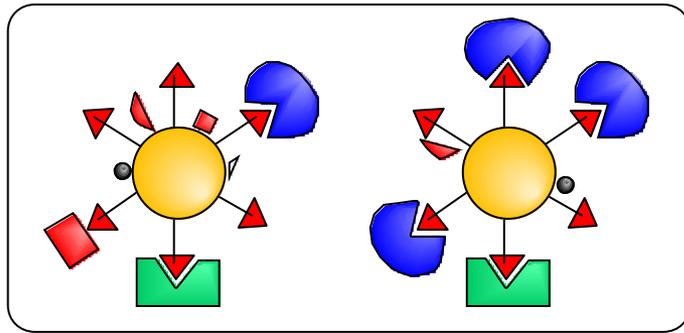
Prohibitin2  
Prohibitin1



カプサイシンを再度固定化しアフィニティ精製を実施したところ、タンパク質の非特異的な吸着が少なく、標的タンパク質を高純度で精製することができました。また同時に、タンパク質の非特異的な吸着を抑えるため、結合・洗浄bufferの塩濃度を50 mMから150 mMとしました。

リガンド固定化量の最適化と並行して、buffer条件などの検討も重要です。

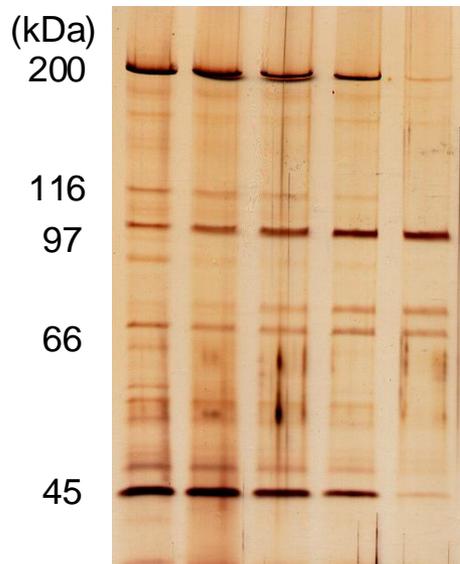
# 結合反応時間～結合タンパク質の時間依存的濃縮



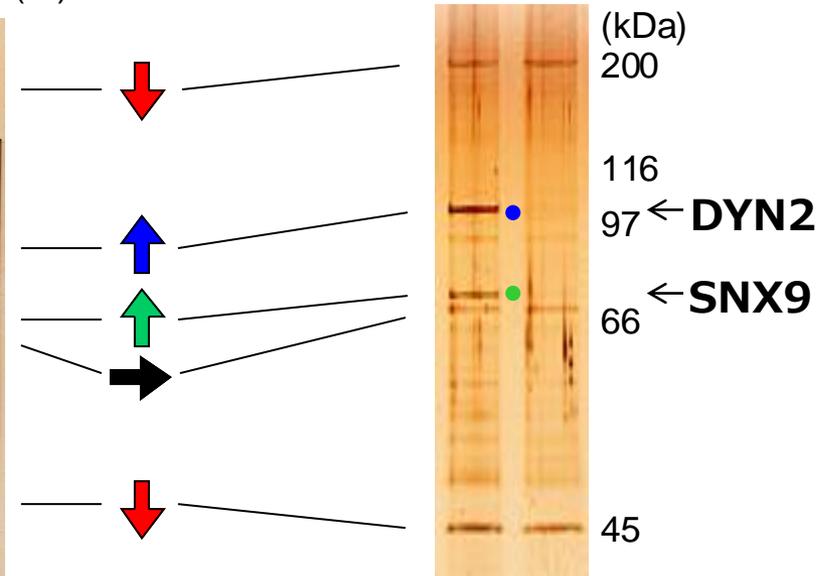
: 既知の標的タンパク質  
 : 非特異的タンパク質

結合反応時間 0.5 1 2 3 4 (hr)

遊離リガンド - +



【結合反応時間を振った結果】



【競合阻害】

結合反応時間0.5時間では多くのタンパク質が結合していますが、4時間では既知の2種の標的タンパク質（青、緑）の結合量が増加しています。これは時間経過により、リガンドへより強く結合する標的タンパク質が、弱く結合していたタンパク質と交換され、標的タンパク質の結合量が増加したと考えられます。

# 標的タンパク質精製実験の流れ&ポイント

## ① リガンドの固定化

- ↓ ・ リガンド固定化量定量 (HPLC)
- ・ リガンド固定化量の検討

- ・ リガンドの設計・構造活性相関
- ・ 対照化合物



## ② リガンド固定化ビーズとタンパク質溶液を混合 (細胞破碎液など)

- ・ 事前に遠心分離
- ・ 細胞抽出液の調製方法 (プロトコール401, 402)

## ③ 結合反応・洗浄・溶出 (塩溶出、ボイル溶出)

- ↓ ・ ビーズの分散 (ガリガリ法)
- ・ 磁気分離

- ・ 結合・洗浄bufferの組成検討
- ・ 結合反応時間

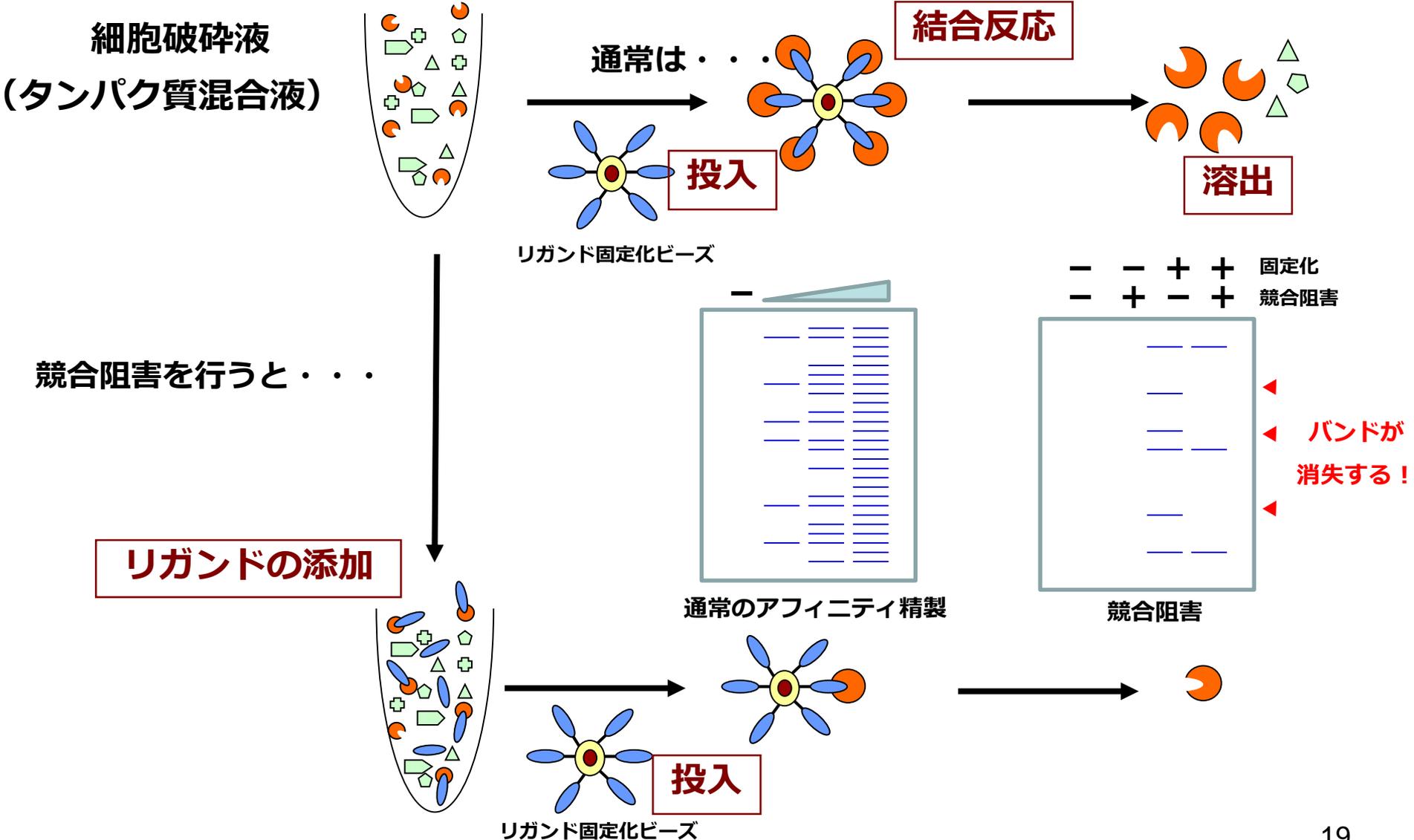
- ・ 特異性の検討
- ・ (競合阻害実験、ドラッグエリユーション)

- ・ アフィニティ精製の注意事項
- (ケラチンのコンタミに注意)

## ④ 解析

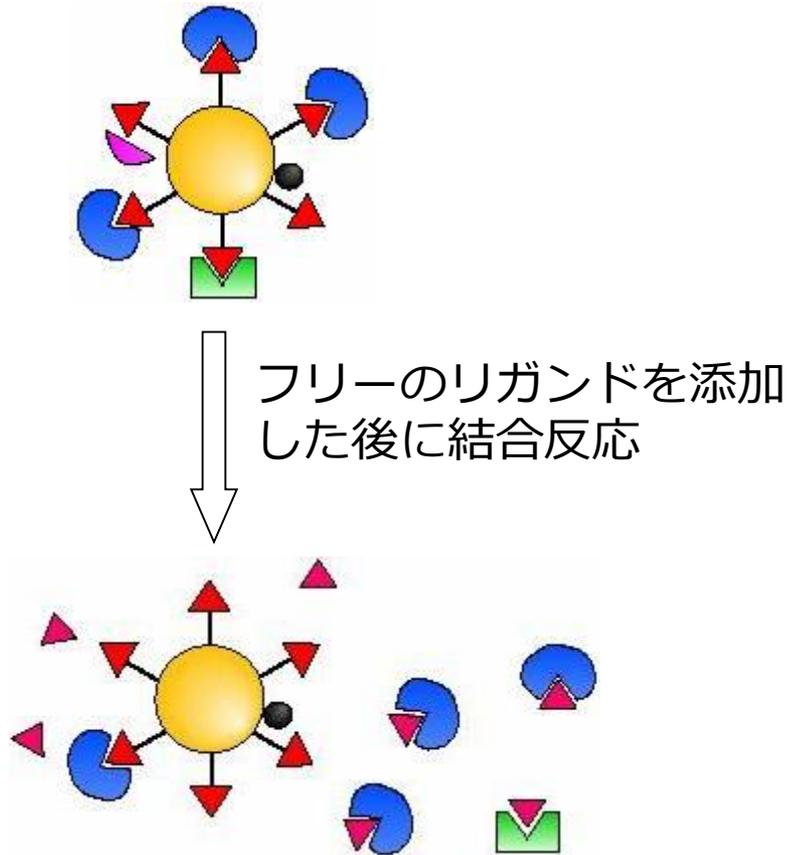
SDS-PAGE、銀染色、MS質量分析

# 競合阻害

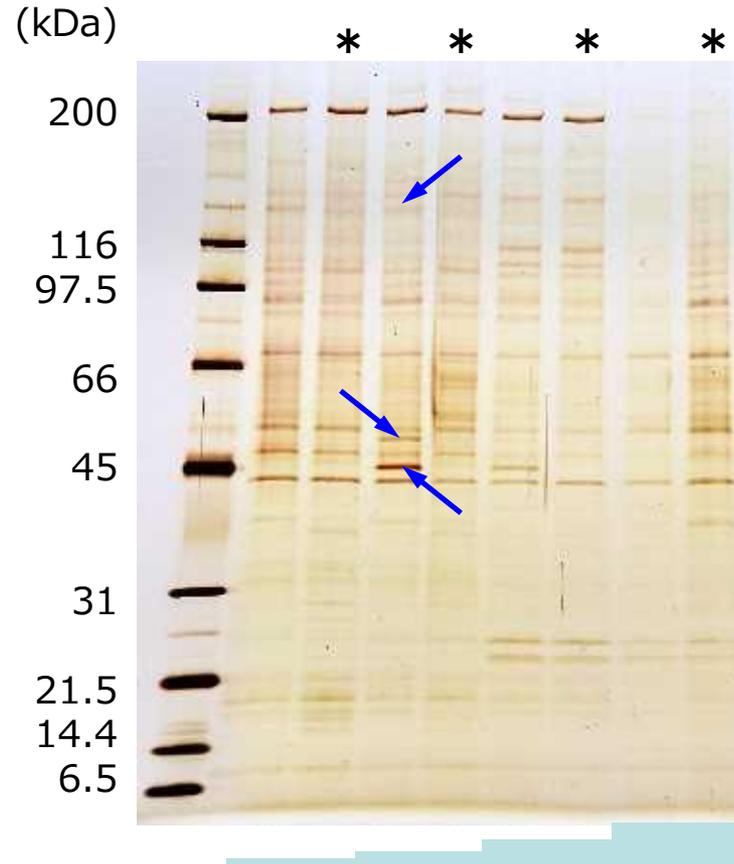


➡ **バンドが消失すれば標的タンパク質である可能性が非常に高い！**

# 競合阻害の例



  : 既知の標的タンパク質

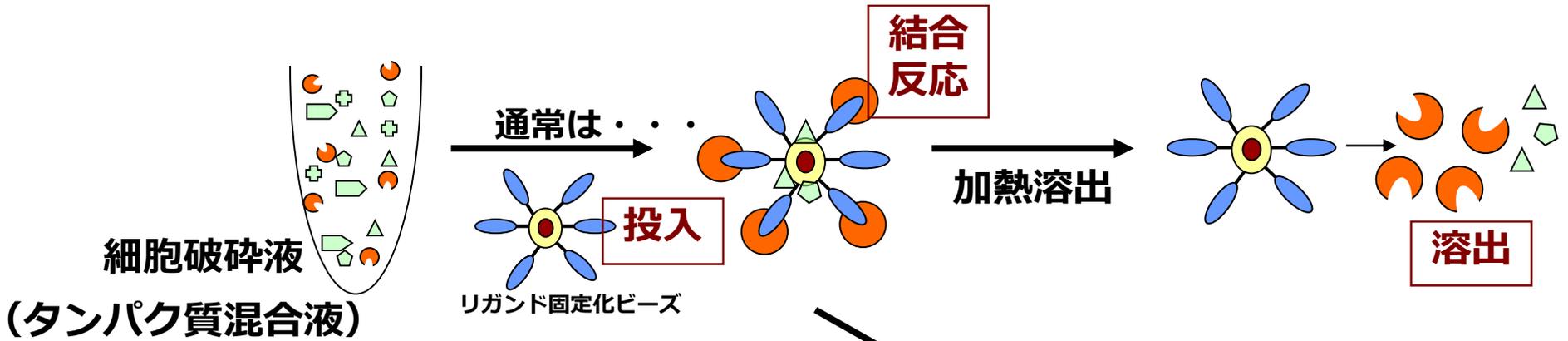


リガンド固定量  
\* : リガンド添加 (競合阻害実施)



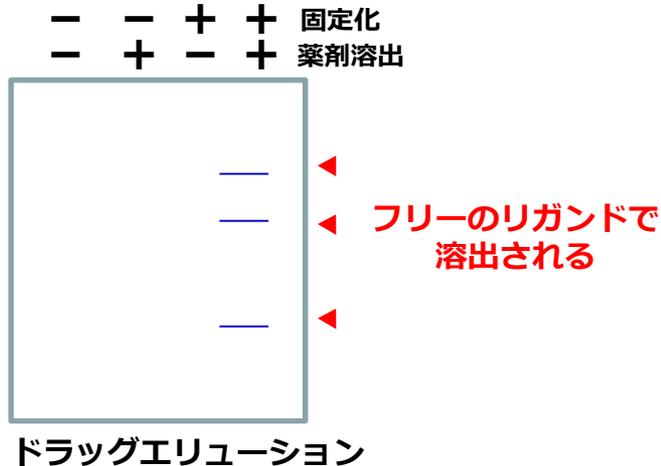
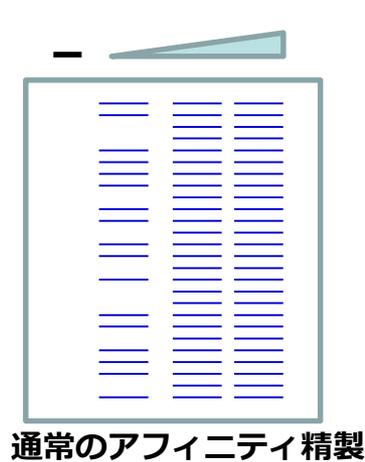
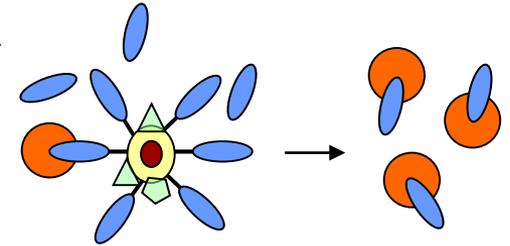
バンドが消失しているため、  
標的タンパク質の可能性が高い。

# ドラッグエリューション



ドラッグエリューションを行うと・・・

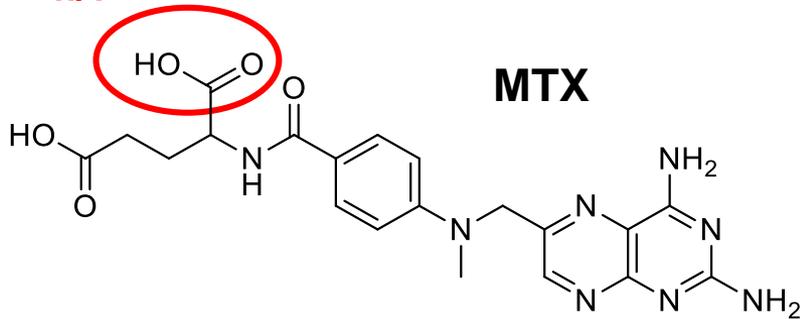
リガンドを添加



➡ フリーのリガンドで溶出されれば標的タンパク質である可能性が高い！

# 競合阻害・ドラッグエリ्यूションの例

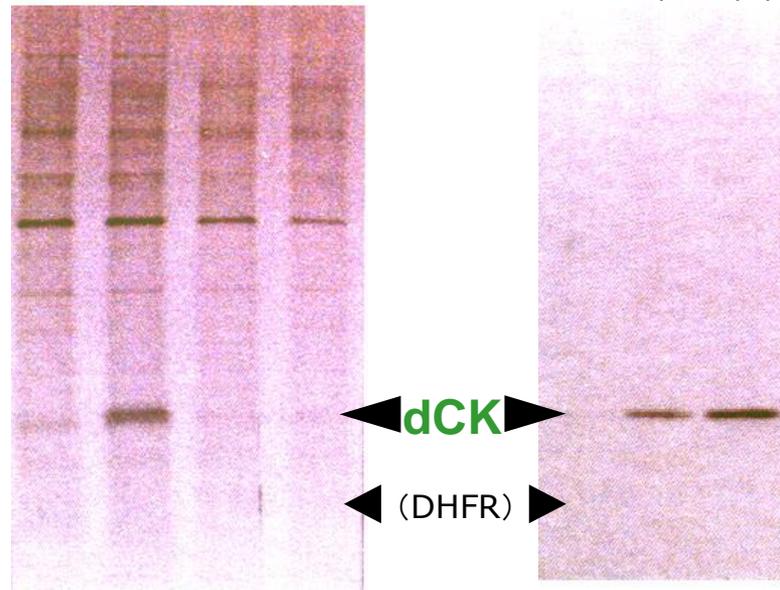
固定化部位



競合阻害

Drug Elution

-	+	+	+	: Immobilized MTX	-	+	+	: Immobilized MTX
-	-	+	++	: MTX Competition	-	+	++	: MTX Elution

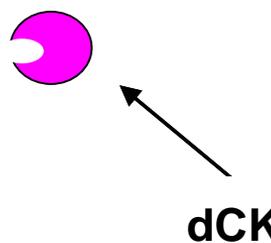
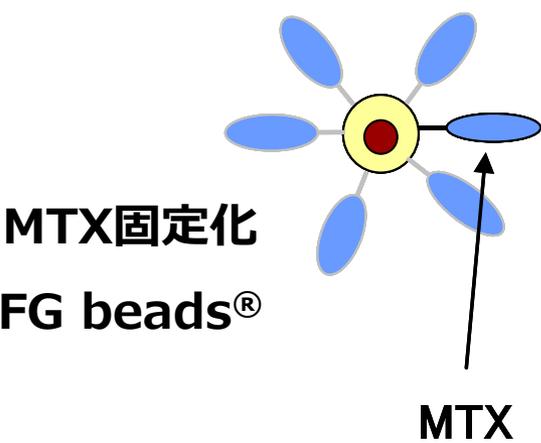


dCK

(DHFR)

(標的タンパク質)

dCK : デオキシシチジンキナーゼ



競合阻害においてMTXの添加で標的タンパク質であるdCKのバンドが消失し、ドラッグエリ्यूションにおいてMTXでdCKのバンドが溶出されています。ドラッグエリ्यूション時のMTX濃度を上げることによって、dCKの溶出量が増えていることも分かります。

# 標的タンパク質精製実験の流れ&ポイント

## ① リガンドの固定化

- ↓
  - ・ リガンド固定化量定量 (HPLC)
  - ・ リガンド固定化量の検討

- ・ リガンドの設計・構造活性相関
- ・ 対照化合物



## ② リガンド固定化ビーズとタンパク質溶液を混合 (細胞破碎液など)

- ・ 事前に遠心分離
- ・ 細胞抽出液の調製方法 (プロトコール401, 402)

## ③ 結合反応・洗浄・溶出 (塩溶出、ボイル溶出)

- ↓
  - ・ ビーズの分散 (ガリガリ法)
  - ・ 磁気分離

- ・ 結合・洗浄bufferの組成検討
- ・ 結合反応時間

- ・ 特異性の検討
- ・ (競合阻害実験、ドラッグエリユーション)

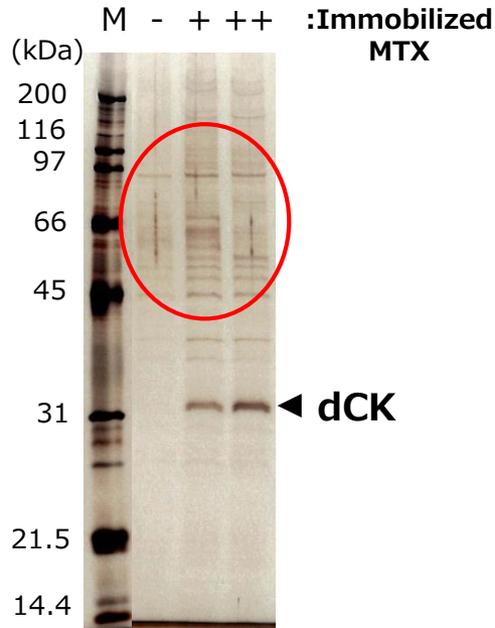
- ・ **アフィニティ精製の注意事項**
- ・ **(ケラチンのコンタミに注意)**

## ④ 解析

SDS-PAGE、銀染色、MS質量分析

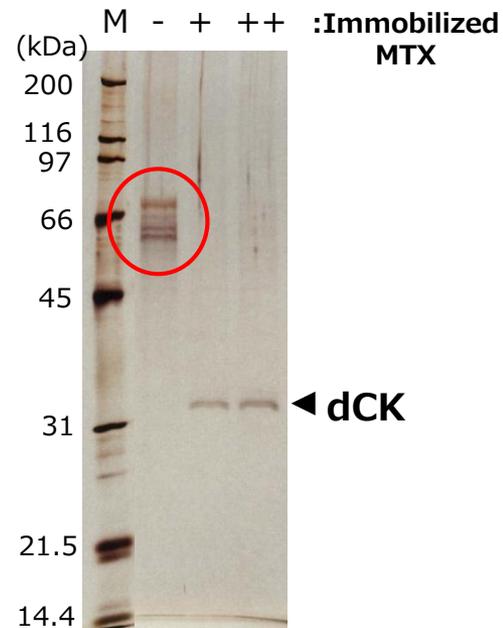
# アフィニティ精製の注意事項

## 実施例1



バックグラウンドが高い

## 実施例 2



ケラチンのコンタミがある



- ・ ビーズの分散をきちんと行う。
- ・ アフィニティ精製の際は手袋を装着する。
- ・ チューブの蓋の内側を触らない。