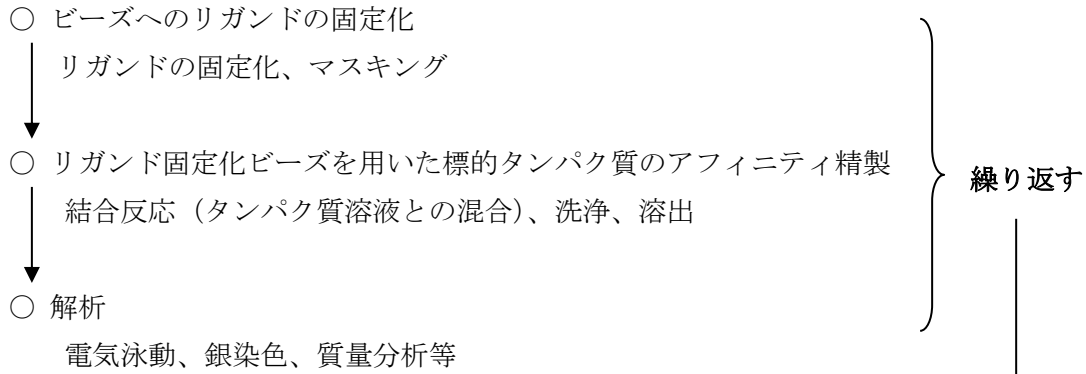


タンパク質精製条件検討の手順

【標的タンパク質精製実験の概略】



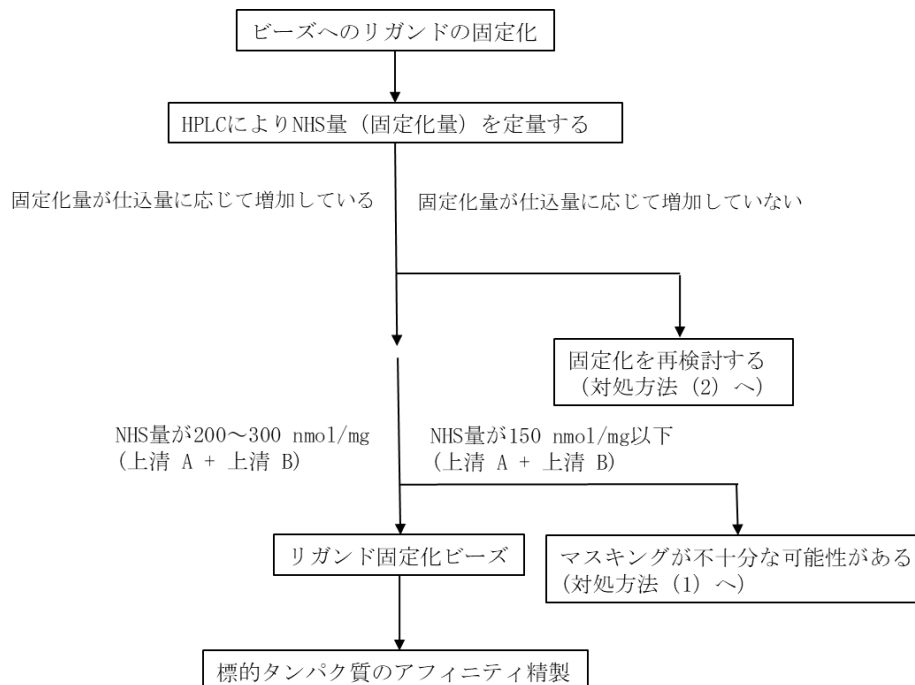
検討項目

- ・ リガンド固定化量
- ・ Buffer 組成（塩濃度等）
- ・ タンパク質溶液濃度または液量
- ・ 結合反応時間
- ・ 競合阻害、ドラッグエリ्यूション

【ビーズへのリガンドの固定化と固定化量の定量について】

○NHS beads へ NH₂ 基を有するリガンドを固定化した場合

高速液体クロマトグラフィー（HPLC）で固定化量の定量が可能です。（プロトコール 201）



<NHS beads へ NH₂ 基を有するリガンドを固定化した場合の固定化量定量結果>

仕込濃度 (mM)	リガンド固定化量 (nmol/mg)									
	MTX	化合物 A	化合物 B	化合物 C	化合物 D	化合物 E	化合物 F	化合物 G	化合物 H	化合物 I
0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
0.1	4.0		10.9	3.6		10.3	7.6	29.2	10.6	13.7
0.2		19.7			21.0					
0.3	9.7		36.0	9.9		36.1	25.2	91.7	34.8	44.7
0.4		43.1								
0.8		92.2								
1	29.2		109.4	34.7	156.7	105.7	82.2	248.7	115.2	150.6

リガンドの構造によって、同じ仕込濃度であっても固定化量は大きく異なります。また、最適な固定化量もリガンドの構造や、buffer 組成、タンパク質溶液の添加量によって異なります。

○他のビーズの場合（NHS beads 以外の場合）

HPLC による固定化量定量が出来ないので、タンパク質との結合実験を行い固定化量を定性的に評価します。

【対処方法】

① 固定化無し（固定化濃度 0mM）にタンパク質の非特異的吸着が見られる。

【原因】

- ・ マスキングが不十分

【対策】

- 脱水品の DMF を使用する。

マスキング工程を再度行う。

（COOH beads を使用する場合は NHS 化工程からのマスキング工程を再度行う。）

マスキング時には超音波分散装置を用いてビーズを十分に分散させビーズの塊が無いことを確認する。

- ・ 洗浄が不十分

- アフィニティ精製時の洗浄回数、量を増やす。

- ・ 細胞抽出液中に不溶性画分が多く含まれる

- ビーズへ混合する前の細胞抽出液は

遠心分離（15,000 rpm、4℃、30 分以上）を行う。

② バンドが全く得られない（0mM に結合タンパク質のバンドが無いが、リガンド固定化ビーズにも結合タンパク質のバンドがない）。

【原因】

- ・ 固定化が出来ていない

【対策】

- 固定化のプロトコールを再度確認する。

HPLC にて定量している場合は、定量結果および定量のプロトコールを確認する。

固定化反応時には超音波分散装置を用いてビーズを十分に分散させビーズの塊が無いことを確認する。

- ・ 固定化量が低い

- 化合物の仕込濃度を増やす。

- ・ タンパク質溶液中に標的タンパク質が無いまたは少ない

- タンパク質溶液の濃度（または量）を増やす。

別のタンパク質溶液を使用する。

- ・ 化合物と標的タンパク質の結合が弱い

- バッファーの塩濃度を下げる。

バッファー中の界面活性剤濃度を 0.1%以下にする。

③ 結合タンパク質のバンドが多い（特異的なバンドの判断がつかない）。

【原因】

- ・ 固定化量が多い

【対策】

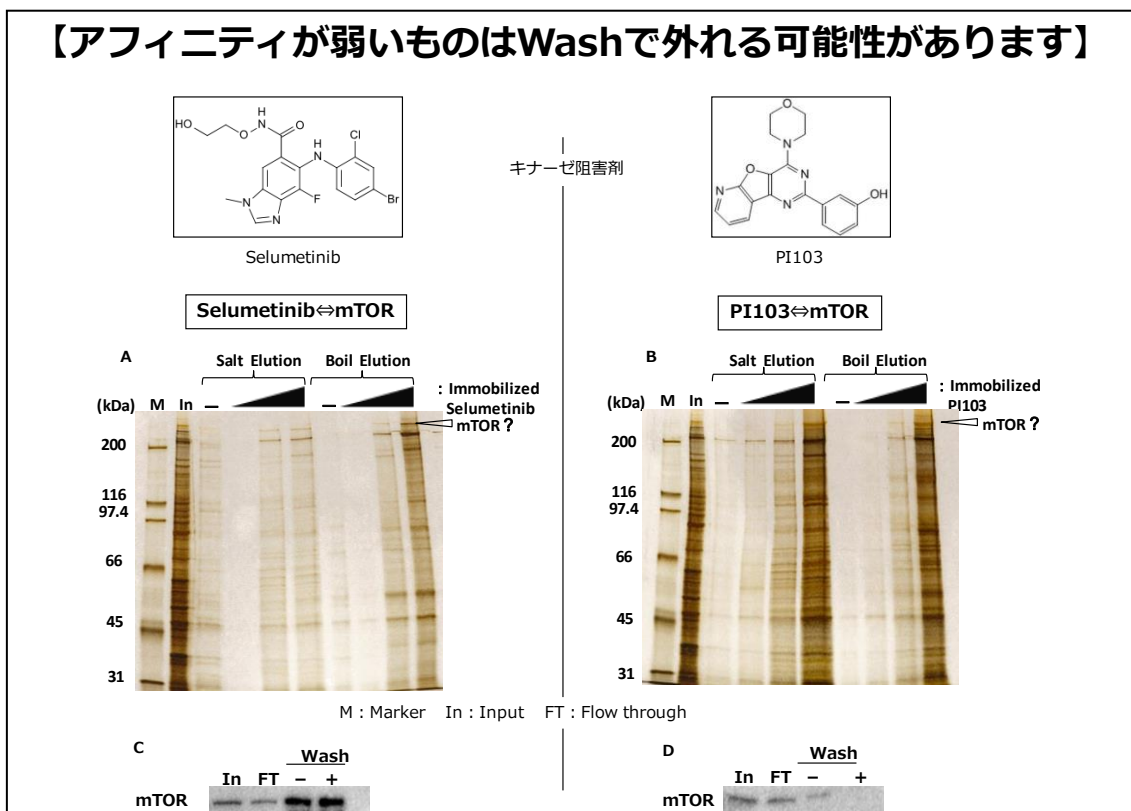
- 固定化濃度を減らす。

- ・ 化合物が疎水的でタンパク質が結合しやすい

- バッファーの塩濃度を上げる。

競合阻害、ドラッグエリ्यूションを行う。

◎リガンドと標的タンパク質とのアフィニティが弱い場合、洗浄を繰り返す（且つ buffer の塩濃度をあげるなど）ことで一旦回収できた結合タンパク質が外れる可能性もあります。

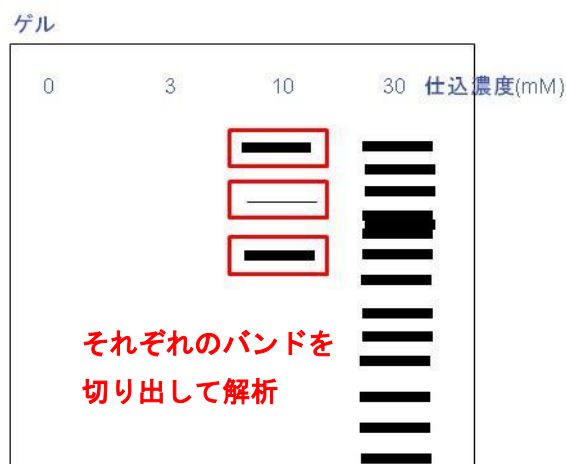


PI103 の場合、結合反応後にビーズの洗浄（Wash）を行うことによって、一旦は回収できた mTOR が外れてしまい精製ができていません。Selumetinib の場合は、洗浄を行っても mTOR は外れず、精製ができています。PI103 と mTOR のアフィニティが弱いものと考えられます。

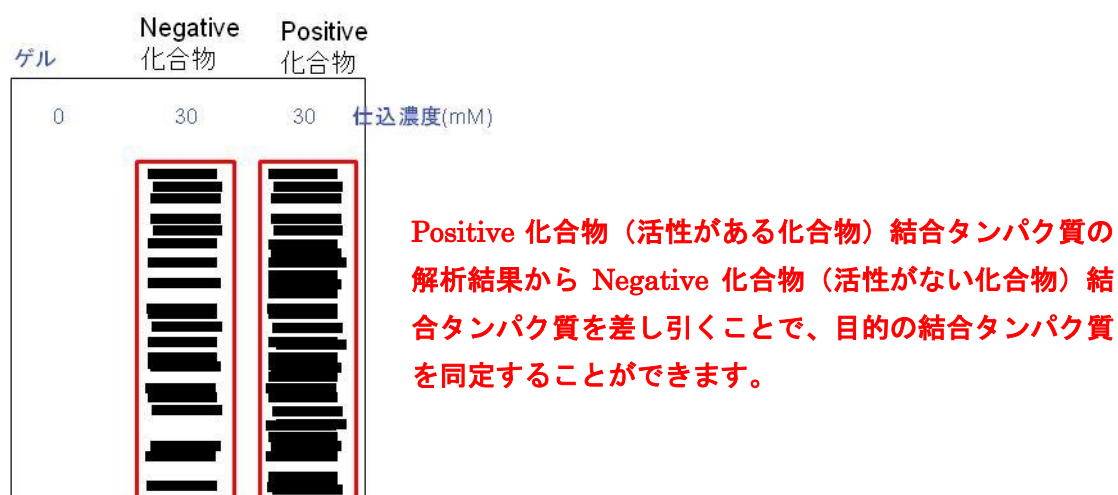
◎結合タンパク質のバンドが多い場合には、ショットガン解析という方法で特異的な結合タンパク質を同定することができます。

【質量分析の方法】

- 方法 1** ゲル分離したタンパク質バンドを切り出し、プロテアーゼ処理して得られた断片ペプチドについて質量分析し、結合タンパク質を同定する。
→ リガンド特異的なバンドを数本に絞って解析する。



- 方法 2** ゲル分離を介さないでビーズから溶出したすべての結合タンパク質をプロテアーゼ処理し、得られた断片ペプチドを網羅的に解析する。(ショットガン解析)
→ 結合タンパク質が多い場合でも解析可能 (ゲルの切り出しを行わない)



〈質量分析サンプルの比較例〉

- Positive 化合物固定化ビーズと Negative 化合物固定化ビーズの精製サンプル
- 化合物固定化無しビーズ (0 mM) と化合物固定化ビーズの精製サンプル
- ドラッグエリ्यूション溶出サンプル：化合物無し、化合物有り
- 競合阻害溶出サンプル：競合阻害無し、競合阻害有り