

■ ユーザーボイス

北海道大学 小原圭介 先生

脂質非対称性の調整機構の研究

■ リバネス研究費 多摩川精機賞受賞者決定

■ 新商品 FF beads、FS beads発売

■ FAQ 免疫沈降について

ユーザーボイス 小原 圭介 先生

北海道大学 大学院薬学研究院
創薬科学部門 生体機能科学分野

研究紹介 脂質非対称性の調整機構の研究

私たちは脂質の非対称性に注目し、研究を行っています。‘脂質’と聞くと悪いイメージが連想されるかもしれませんが、生物にとって必須の成分であり、細胞の構成に深く関わっています。その中でもいくつか重要な役割がありますが、最も重要な役割は‘膜を作る材料となる’ということです。

脂質分子は、親水部(頭部)と疎水部(尾部)で構成されており、それが尾部を向かい合わせて二重層を形成することにより、細胞や細胞内小器官の膜を構成しています。二重層を形成している脂質分子は、外側と内側の層、つまり表と裏では組成や役割が全く異なっており、私たちはこれを「脂質の非対称性」と呼んでいます。これはオセロの石をイメージすると分かりやすいと思います。

この非対称性は膜を介した多くの現象に関わっているため、非対称性は常に適切な状態に調整されている必要があります。この調整が完全に破綻すると細胞は生きていけず、部分的な破綻でも胆汁うっ滞、糖尿病等の疾患が生じてきます。

脂質非対称の状態変化はフリップ・フロップという脂質分子の内外層間の動きによりもたらされますが、これにはフリップラーゼ、フロップラーゼというタンパク質が関与しています。最近、私たちの研究により、脂質分子のフロップに関わるOpt2というタンパク質が見出されました。これまでにいくつかのフロップラーゼが報告されていますが、Opt2は従来のものとは構造等が大きく異なり、新種のフロップラーゼではないかと期待しています。

そこで、Opt2のフロップ活性を調べるために、まずはOpt2を精製し、回収する必要があります。Opt2は主にゴルジ体の膜に局在する膜タンパク質であるため、活性を維持したままの精製は非常に困難でしたが、膜の小胞化と、Opt2に付加したHAタグを利用した免疫沈降により、膜に埋まっている状態のOpt2の回収に成功しました。まだまだ完全な系ではありませんが、世界でもこれまでに報告がない「フロップ活性の直接的測定」の実験系の構築に目処がついたため、今後回収したOpt2を用いて様々な評価を行う予定です。

FG beads® (Protein G)と抗HAタグ抗体を用いた免疫沈降で、Opt2を高純度/高回収率で回収!

膜に埋まっている状態のOpt2を回収するために、まずはライセートに超音波処理を行ってゴルジ体の膜をいくつかの小胞に分裂させ、Opt2を含む小胞を調製しました。次に、Opt2のN末端に付加したHAタグを利用し、FG beads®と抗HAタグ抗体を用いてOpt2を含む小胞の免疫沈降を行いました。溶出では、HAペプチドによる競合法により、非変性的に溶出を行いました。(図1)そして、溶出した小胞の一部をSDS-PAGE、ウエスタンブロットに供し、精製の状態を評価しました。(図2)

ウエスタンブロットの結果から、Input画分に対し、非結合画分にはOpt2はほとんどが存在せず、溶出画分には多くのOpt2を確認することができます。また、溶出画分への非特異的な小胞の混入も確認するために、Pma1、Dpm1、Pho8、Pep12といった膜タンパク質(それぞれ、細胞膜、小胞体、液胞、エンドソームに局在)についても評価を行ったところ、いずれのタンパク質も溶出画分には存在せず、非結合画分にほとんどが存在することが確認されました。Opt2はエンドソームにもわずかに局在するため、エンドソームの膜が小胞化した際に、そこにOpt2とPep12が混在することもあるため、Pep12はわずかに検出されています。Opt2の高純度な回収が可能となったため、今後は活性測定やOpt2変異体の作製等を行い、詳細な解析を行っていく予定です。

膜画分を超音波処理によって小胞化

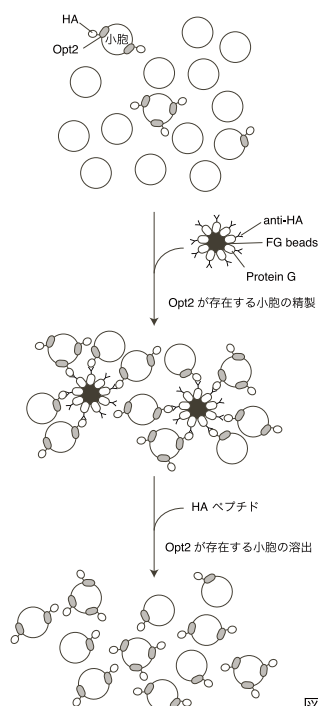


図1

ビーズ担体としては、FG beads®の他にM社やG社のものも試してみましたが、初期検討の段階で、FG beads®ではOpt2が回収できたのですが、他社ビーズでは回収ができなかったため、実験ではFG beads®を使用することにしました。FG beads®を使用していて感じたことは、粒子径が小さく分散性が高いため、より液体の感覚に近い状態で操作を行えた点です。また、ウエスタンブロットの結果からも分かる通り、非特異的な吸着が少なく、高回収率である点も実感することができました。

今回の研究は学部生の内堀君が主に取り組んでくれました。膜タンパク質であるOpt2の精製に向けた条件検討など、多くの困難がありましたが、彼の粘り強い取り組みによってスタート地点に立てたと思っています。

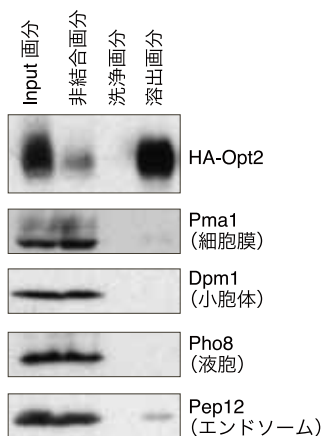


図2



●研究室でのディスカッションの様子

経歴

小原 圭介(おばら けいすけ)

2001年~2004年 日本学術振興会特別研究員(DC1)
2004年 東京大学大学院 理学系研究科 博士課程修了
2004年~2008年 基礎生物学研究所 博士研究員
2008年~ 北海道大学大学院 薬学系研究院 助教、現在に至る

おめでとうございます

リバネス研究費 多摩川精機賞 受賞者決定!!

東京工業大学 佐藤 伸一 先生

この度、リバネス研究費を通じてFG beads®を活用した分子生物学、ケミカルバイオロジー分野の優れた研究を募集致しました。数多くの応募を頂いた中で、東京工業大学 資源化学研究所 佐藤先生を多摩川精機賞に決定致しましたので、研究内容をご紹介します。

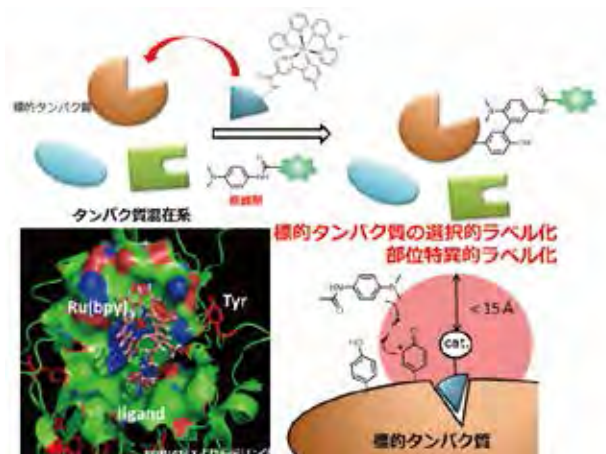
佐藤先生の研究室では有機合成化学をベースに、創薬研究、ケミカルバイオロジー研究分野における技術革新を目指した研究を展開しています。特に、佐藤先生は局所環境下におけるラジカル反応によるタンパク質選択的修飾法の開発に取り組んでいます。

タンパク質の分子修飾は生命科学の研究において有用な手法であるにもかかわらず、現在汎用されている手法はLys、Cysといった求核性アミノ酸残基を求電子的な試薬により反応させて化学修飾させるといった方法に限られています。

佐藤先生は現在までに光触媒であるRu(bpy)₃錯体を用いた一電子移動型の反応により、Tyr残基に対する修飾法の開発に成功しています。

また、この触媒を用いれば、局所的なラジカル反応制御によりタンパク質の混在系の中で目的タンパク質の特定部位の化学修飾が可能です。

佐藤先生の化学修飾法はケミカルバイオロジー研究における低分子化合物の標的タンパク質同定にも応用でき、今後の展開に期待しています。



新商品 FF beads、FS beads 発売

ビーズ内部へ蛍光色素を含有した蛍光ビーズの販売を開始しました。磁性を持っているFF beadsと非磁性のFS beadsをラインナップしています。蛍光色素には励起波長と蛍光波長の離れたユウロピウム錯体を使用していますので、目的物質の高感度な検出や定量、可視化の目的で使用可能です。イムノアッセイやイムノクロマト、組織染色など幅広いアプリケーションに応用できます。現在ご使用の蛍光ビーズや酵素法にご不満な方や新規な系を検討中の方はぜひ、FF beads、FS beadsをお試ください。

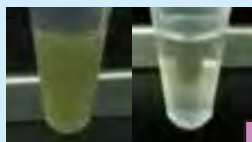
特徴

- 磁気分離が可能 (FFビーズ)
- 蛍光色素にはユウロピウム錯体 (励起波長340nm・蛍光波長616nm)
- サブミクロンサイズ (分散性が高く、表面積が大きい)

参考文献 / 1) Sakamoto S, et al. *Clinical Chemistry*, 2014, 60:4, 610-620.
2) Terada K, et al. *Int. J. Anal. Bio-Sci.*, 2014, 2:3, 101-107.

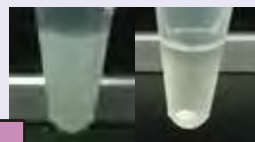
FF beads

分散状態 磁気分離後



FS beads

分散状態 遠心分離後



UV照射

品 名	型 式	官 能 基	磁性	粒子径	容 量	希望小売価格
FF Linker beads	TAB8849N2110	エポキシ基	有	200nm	1mg	11,000円
					5mg	44,000円
					20mg	110,000円
FF COOH beads	TAB8849N2140	カルボキシル基			1mg	15,000円
					5mg	60,000円
					20mg	150,000円
FS Linker beads	TAB5849N2110	エポキシ基	無	400nm	1mg	11,000円
					5mg	44,000円
					20mg	110,000円
FS COOH beads	TAB5849N2140	カルボキシル基			1mg	15,000円
					5mg	60,000円
					20mg	150,000円

お問い合わせは裏面記載の研究所、または各営業所まで

FAQ — 免疫沈降について

Q1. 抗体を固定化させる際に最適なビーズはどれですか？

非特異的吸着を抑えたい場合には表面のCOOH基を活性化させたNHSビーズを使用し、抗体を直接ビーズに固定化します。また、NHSビーズは解析時に抗体の遊離が少ないという利点があります。ただし、抗体のリジン残基とビーズ表面のNHS基で共有結合させるため、配向がランダムになります。抗体の配向をそろえたい場合や抗原の回収量を増やしたい場合には、Protein Aビーズ、Protein Gビーズをご使用ください。また、ビオチン化した抗体をお持ちの場合はストレプトアビジンビーズ、ニュートラアビジンビーズへの固定化が可能です。

Q2. 抗体の固定化量を定量する方法はありますか？

固定化量の定量は固定化後のビーズの直接定量にて行えます。方法はホームページのプロトコル No.107 をご参照ください。

Q3. 抗体の固定化効率(固定化量)を上げる方法はあるですか？

いくつかの方法があります。下記参照ください。

- ①NHSビーズの場合は固定化反応時間を長くすることで固定化量が増える場合があります。ただし、NHS基は加水分解を受けやすく、非特異的吸着の要因となるため、6時間以内として下さい。
- ②NHSビーズの場合は推奨固定化バッファ以外の組成によって固定化反応が阻害される場合があります。抗体保存溶液に塩などの添加物が含まれる場合はバッファ置換を行うことで固定化効率が上がります。
- ③固定化反応時の抗体添加量を上げることで固定化量が増加します。

Q4. 抗体固定化ビーズの分散には超音波を使用しても良いですか？

ビーズの分散はガリガリ法を推奨しております。超音波による分散を実施される場合は、氷冷下、断続的に超音波を当ててください。ガリガリ法についてはホームページの動画をご参照ください。

Q5. 固定化反応の際、チューブ壁面へビーズが付着してしまうことがあります。抑える方法はあるですか？

抗体の固定化によってチューブ内壁へのビーズの付着が生じる場合があります。タンパク質低吸着チューブを用い、攪拌を転倒混和でなくマイクロチューブミキサーによる攪拌にすることで改善することがあります。

Q6. 抗体固定化後のビーズの分散性を向上させたいのですが、どうすれば良いですか？

抗体やタンパク質を固定化すると、ビーズが沈殿しやすくなる場合があります。使用前にビーズを良く分散させて使用頂ければ問題ありませんが、更に分散性を向上したい場合、保存バッファから塩を除くことで分散性が向上します。

その他のFAQはHPを見てね★
「FGビーズ」で検索



編集 後記

ユーザーボイスでは脂質非対称性の調整機構について研究されている、北海道大学の小原先生にお話を伺いました。FG beads®は免疫沈降でも非特異的吸着が少なく、高い回収率でターゲットの回収ができたとお聞きしました。非特異的吸着や回収率などでお悩みの皆様、ぜひ、FG beads®をお試しください。当社ではより良い情報をお届けするため、皆様のご意見・感想をお待ちしています。ご意見・感想はこちらまで ▶ FGbeads@tamagawa-seiki.co.jp

Tamagawa 多摩川精機株式会社

【技術的なお問い合わせ】

多摩川精機株式会社 バイオトロンクス研究所

〒395-8515 長野県飯田市大休1879番地
FGbeads@tamagawa-seiki.co.jp
TEL (0265) 21-0501 (平日9:00~17:00)
FAX (0265) 21-1896

【ご注文・販売に関するお問い合わせ】

多摩川精機販売株式会社

バイオ営業部 TEL (0265) 56-5421 FAX (0265) 56-5426
北関東営業所 TEL (048) 833-0733 FAX (048) 833-0766
名古屋営業所 TEL (0568) 35-3533 FAX (0568) 35-3534
大阪営業所 TEL (06) 6307-5570 FAX (06) 6307-3670
福岡営業所 TEL (092) 437-5566 FAX (092) 437-5533

販売店

<http://www.tamagawa-seiki.co.jp>
<http://www.magneticnanoparticle.jp>

●2015年9月1日発行 ●編集・発行／多摩川精機株式会社 バイオトロンクス研究所