

膜タンパク質等を可溶化したい

使用製品

<i>n</i> -Octyl-β-D-glucoside	[O001]	GEDTA(EGTA)	[G002]
Sodium cholate (purified)	[C321]	HEPES	[GB10]
<i>n</i> -Heptyl-β-D-thioglucoiside	[H015]	MOPS	[GB13]
CHAPS	[C008]	PIPES	[GB15]
2K(EDTA・2K)	[K001]	Tricine	[GB19]

I はじめに¹⁻³⁾

生命の最小単位である細胞や細胞内小器官(オルガネラ)は、膜によって内と外に区別されている。膜の基本構造はリン脂質二分子層である。細胞が生きていく上で必要な物質の輸送、エネルギーの変換、情報の伝達はすべてこの膜を介して行われる。この膜の機能の大部分は膜に存在する膜タンパク質によって行われる。これらの膜タンパク質の構造や機能を解析する場合、目的とするタンパク質を抽出(可溶化)・精製する事が必要不可欠である。

膜に強く結合しているタンパク質は次のようにイメージできる。タンパク質の疎水部はリン脂質二分子膜の疎水部に埋没し、親水部は水相に突き出した状態にある。このように水に不溶な巨大分子を取り出す(可溶化する)には、界面活性剤の助けを必要とする。界面活性剤はタンパク質の疎水部に相互作用し、タンパク質を水になじませ水相に可溶化する事ができる。

膜タンパク質を可溶化する場合、最も重要なことは、目的タンパク質を失活させないで取り出すことができる界面活性剤の選択にある。一般的に、膜タンパク質の可溶化等に用いる界面活性剤に望まれる性質は、

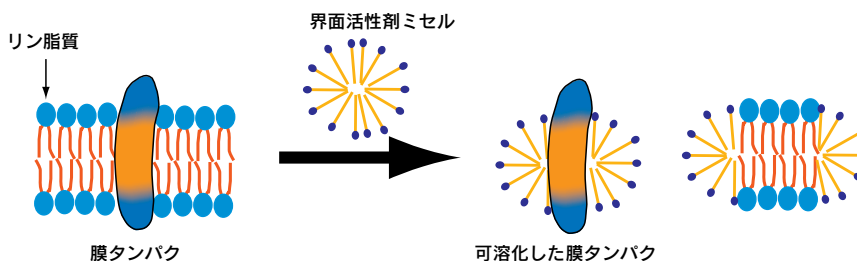
- 1) 可溶化能が高い(少なくとも、目的のタンパク質を十分可溶化できること)。

- 2) 目的のタンパク質を変性・失活させないこと。
- 3) タンパク質の活性測定系で妨害作用を示さないこと。
- 4) 低温でも十分な水溶性を持っていること。→通常タンパク質は0~4℃で取り扱うことが多い。
- 5) CMCとミセルサイズが適当であること。→界面活性剤の除去やゲルろ過を行うときに重要。
- 6) 紫外外部吸収を示さないこと。→280 nmでのタンパク質の定量が可能。
- 7) 毒性がないこと。
- 8) それ自身を定量する簡便な方法があること。
- 9) また、イオン交換クロマトグラフィーを行う場合は、非イオン性であること。等である¹⁾。

(土屋友房著、“膜タンパク質の可溶化と界面活性剤”(廣川書店)より一部引用)

現在のところ、すべての膜タンパク質の可溶化に有効な万能の界面活性剤は知られていない。試行錯誤を繰り返しつつ選ばれているのが現状である。

また、界面活性剤の使用条件の最適化、例えば界面活性剤の濃度、界面活性剤と膜の比率、緩衝液の種類、pH、共存イオン、脂質添加の可否、温度等について考慮、検討する必要がある。



II *n*-Octyl-β-D-glucoside を用いた大腸菌ラクトース輸送担体の可溶化^{1,4)}

1. 試薬

- ・ lac Y 組み換え大腸菌 T206 より調製した膜小胞
- ・ *n*-Octyl-β-D-glucoside(Code: O001)
- ・ Sodium cholate(Code: C321)
- ・ Dithiothreitol(DTT)
- ・ 大腸菌由来リン脂質 (Avanti Polar Lipids. 社、もしくは参考文献 5)参照)
- ・ DEAE-Sepharose CL-6B(GE ヘルスケア社)
- ・ リン酸カリウム
- ・ ラクトース
- ・ 尿素(生化学用)
- ・ リン酸

2. 方法

以下の操作は、特にことわらない限り4℃で行う。また、ほとんどの攪拌にはVortex mixerを用いた。

- 1) 別に調製した反転膜小胞 12.5 mg を 10 mg タンパク質 / ml となるように緩衝液 (50 mmol/l リン酸カリウム、pH7.5、0.5 mmol/l DTT、10 mmol/l ラクトース) に懸濁する。

- 2) 等量の尿素溶液 (10 mmol/l) を室温下で攪拌しながら滴下する。
- 3) 氷浴中で 10 分間放置し、175,000 x g で 1 時間遠心する。
- 4) 沈殿を 1.75 ml の緩衝液 (50 mmol/l リン酸カリウム、pH7.5) に懸濁し、Sodium cholate が終濃度で 6% となるように Sodium cholate 溶液 (20% w/v, pH7.8) を攪拌しながら加える。
- 5) 氷浴中で 20 分間放置後、26,000 x g で 15 分間遠心する。(これまでの操作で、膜の不要タンパク質が除去されている)
- 6) 沈殿を 5 ml の緩衝液 (10 mmol/l リン酸カリウム、pH5.8) に懸濁し、遠心を繰り返す。
- 7) 沈殿を 1.45 ml の緩衝液 (10 mmol/l リン酸カリウム、pH5.8) に懸濁し、DTT 溶液 (100 mmol/l) 17.5 μl、ラクトース 13 mg、リン脂質溶液 (50 mg/ml) 131 μl を加え攪拌する。
- 8) これに、*n*-Octyl-β-D-glucoside の終濃度が 1.25% となるように、*n*-Octyl-β-D-glucoside 溶液 (15% w/v、10 mmol/l リン酸カリウム、pH5.8) 146 μl を加える。このとき、タンパク質 / リン脂質 / 界面活性剤の比率は、1 : 3 : 10 となる。
- 9) これを泡立たないように注意してよく攪拌し、氷浴中で 10 分間放置してからさらに攪拌した後、175,000 x g で 1 時間遠心する。

技術的な内容に関するお問い合わせ先：カスタマーサポート Free Fax:0120-021557 Free Dial:0120-489548

在庫や価格(記載容量以外もしくはrequest)に関するお問い合わせ：マーケティング部 Tel:096-286-1515 Fax:096-286-1525 (株)同仁化学研究所

- 10) 上清を取り、リン酸 (10 mmol/l リン酸, 1.25% の *n*-Octyl-β-D-glucoside を含む) で pH5.8 に合わせる。
- 11) 1 ml のタンパク質抽出液 (約 300 μg のタンパク質を含む) を、前もって準備した DEAE-Sepharose カラムにて精製する。
 溶出液: 10 mmol/l リン酸カリウム、pH5.8、1 mmol/l DTT、20 mmol/l ラクトース、0.25 mg リン脂質 / ml、1.25 % (w/v) *n*-Octyl-β-D-glucoside

III *n*-Heptyl-β-D-thiogluconide を用いた腸炎ビブリオの膜結合性 5'-ヌクレオチダーゼの可溶化^{1,6)}

1. 試薬

- ・フレンチプレス法にて調製した反転膜小胞
- ・*n*-Heptyl-β-D-thiogluconide (Code: H015)
- ・EDTA-2K (Code: K001)
- ・Dithiothreitol (DTT)
- ・Tricine (Code: GB19)
- ・MOPS (Code: GB13)
- ・Tris
- ・塩化ナトリウム
- ・硫酸マグネシウム
- ・2-Mercaptoethanol
- ・DEAE-Sepharose CL-6B (GE ヘルスケア社)

2. 方法

以下の操作は、特にことわらない限り 4°C で行う。

- 1) 腸炎ビブリオの反転膜小胞 (タンパク質 145 mg を含む) を緩衝液 (3 mmol/l Tricine-Tris、pH8.0、0.5 mmol/l EDTA-2K、1 mmol/l 2-Mercaptoethanol) 30 ml に懸濁し、約 30 分間氷浴中でゆるやかに攪拌した後、105,000 x *g* で 1 時間遠心する。
- 2) タンパク質濃度が 1 mg/ml となるように *n*-Heptyl-β-D-thiogluconide 40 mmol/l を含む緩衝液 (20 mmol/l MOPS-Tris、pH7.5、5 mmol/l 硫酸マグネシウム、1 mmol/l DTT) に懸濁し、氷浴中で 15 分間ゆるやかに振とうする。
- 3) 105,000 x *g* で 1 時間遠心して、5'-ヌクレオチダーゼが可溶化された上清を得る。
- 4) これを、前もって準備した DEAE-Sepharose カラムにて精製する。
 溶出液: 50 mmol/l MOPS-Tris、pH8.0、5 mmol/l 硫酸マグネシウム、1 mmol/l DTT、40 mmol/l *n*-Heptyl-β-D-thiogluconide、100 → 400 mmol/l (グラジエント) 塩化ナトリウム

IV CHAPS を用いたマクロファージの細胞骨格の露出 (参考文献 7 の改良法)^{7,9)}

1. 試薬

- ・ *S. typhimurium* LPS (Difco 社)
- ・ ウシ胎児血清 (FBS)
- ・ ヘパリン
- ・ Dulbecco's MEM (DMEM)
- ・ プラスチックカバースリップ (住友ベークライト社、セルデスク)
- ・ PIPES (Code: GB15)
- ・ HEPES (Code: GB10)
- ・ GEDTA (Code: G002)
- ・ Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA、Sigma 社)
- ・ 塩化マグネシウム
- ・ CHAPS (Code: C008) (シリカゲルデシケター中で 2 週間ほど乾燥させて使用)

2. 方法

- 1) *S. typhimurium* LPS を 200 μg/ml に滅菌蒸留水で調製し、マウス (SLC-ICR、7~10 週齢) 1 匹あたり 0.25 ml 腹腔内に注射する。
- 2) 5~6 日後に 10% FBS、10 U/ml ヘパリンを添加した 10 mmol/l HEPES 含有 DMEM (pH7.1) で腹腔洗浄し、細胞を採取する。
- 3) この付着性腹腔細胞を 4°C の DMEM で 3 回遠心洗浄 (1,000 rpm、10 分間) する。
- 4) 10% FBS 含有 DMEM で 10⁶ cells/ml となるように調製し、シャーレに移す。
- 5) 4°C で一夜 FBS コートしたプラスチックスリップを DMEM で 10 分間洗浄し、10⁶ cells/ml に調製されたシャーレに入れ、37°C で 20 分間 CO₂ インキュベーターで培養する (スリップ 1 枚に細胞液 1 ml)。
- 6) 4°C の DMEM を入れたシャーレに細胞の付着したプラスチックスリップを 1 枚ずつ入れ、パスツールピペットで非付着細胞を取り除く。
- 7) 希釈した PMA を添加した 10% FBS 含有 DMEM で、37°C で 20 分間 CO₂ インキュベーターで培養する。
- 8) 得られた細胞付着スリップを室温の DMEM で 10 分間洗浄する。
- 9) さらに室温の PHEM buffer (60 mmol/l PIPES、25 mmol/l HEPES、10 mmol/l GEDTA、2 mmol/l 塩化マグネシウム、pH6.9) で 10 分間、2 回洗浄する。
- 10) あらかじめ、37°C にした PHEM buffer に細胞付着スリップを移し、5 分程度なじませる。
- 11) 6 cm のガラスシャーレに PHEM buffer で 0.5% に調製した CHAPS 溶液^{※2,3)} を 15 ml 程度入れ^{※4)}、ふたを逆さまにのせ、溶液温度を 37°C にする。
 これに、細胞付着スリップを入れ (1 枚のシャーレに 2 枚程度のスリップ)、3 分間骨格を露出する。この時、45~60 秒間に一度軽くシャーレを揺り動かす。
- 12) 37°C の PHEM buffer で 3 回洗浄する (2~3 分、10 分、10 分)。後は室温の PHEM buffer に戻し、細胞骨格試料とする。

※1 この洗浄が十分でないと、細胞骨格の露出率が低下します。

※2 CHAPS 溶液は使用前 1 時間以内に調製し、泡立たないように注意して混和して下さい。また、CHAPS の濃度は正確に 0.5% (8.132 mmol/l) として下さい。濃度が高すぎると、カバースリップからはがれ落ちる細胞が増え、一部細胞骨格が溶出されることがあります。また濃度が薄ければ、細胞膜の可溶化がうまくいきません。

※3 CHAPS の溶液量の目安は、φ13.5 mm のカバースリップ 1 枚につき 6 ml 以上です。

※4 振とうが強すぎると、細胞がはがれてしまうので注意して下さい。

V CHAPS を用いたプロトプラストからの液胞の単離⁸⁾

1. 試薬

- ・ *Atriplex gmelini* の緑葉から調製したプロトプラスト (1.2 mol/l Sorbitol 中で単離)
- ・ CHAPS (Code: C008)
- ・ GEDTA (EGTA) (Code: G002)
- ・ HEPES (Code: GB10)
- ・ Sorbitol
- ・ Tris

細胞
増殖 / 毒性
酸化
ストレス
分子
生物学
細胞内
蛍光プローブ
細胞
染色
ミトコンドリア
関連試薬
細菌研究用
試薬
膜タンパク質
可溶化剤
ラベル
化剤
二価性
試薬
イオン
電極
その他
機能性
有機材料

細胞
増殖/毒性
酸化
ストレス
分子
生物学
細胞内
蛍光プローブ
細胞
染色
ミトコンドリア
関連試薬
細菌研究用
試薬
膜タンパク質
可溶化剤
ラベル
化剤
二価性
試薬
イオン
電極
その他
機能性
有機材料

2. 方法

- 1) プロトプラスト 1 ml を Babcock bottle に入れる^{※1}。
- 2) これに緩衝液 (1.0 mol/l Sorbitol、1 mmol/l GEDTA、0.5 mmol/l CHAPS、20 mmol/l HEPES-Tris、pH8.0)50 ml を加え、120 x g で 3 分間遠心する。
- 3) 上清中の液胞を集め (約 1.2 ml^{※2})、Babcock bottle に入れる。
- 4) これを緩衝液 (1.0 mol/l Sorbitol、20 mmol/l HEPES-Tris、pH8.0) で 20 倍に希釈し、120 x g で 3 分間遠心して、上清中に浮遊している液胞を回収する。

※1 プロトプラストを 0.5 mol/l Sorbitol で単離する場合は、10% Ficoll 400 等を添加して、プロトプラストを浮遊させる。

※2 プロトプラストが上清に濃縮されない場合は、Ficoll 400 等で溶液の比重を高める。

参考文献

- 1) 土屋友房, “膜タンパク質の可溶化と界面活性剤”, 化学と生物実験ライン 5, 廣川書店, **1990**.
- 2) 笠原道弘, “有機物の膜輸送系の再構成と精製”, 蛋白質核酸酵素, **1979**, 24,1077.
- 3) 広瀬茂久, “血管作動性ホルモン受容体の研究と界面活性剤”, Dojin News, **1987**, 39, 3.
- 4) M. J. Newman, D. Foster, T. H. Wilson, H. R. Kaback, *J. Biol. Chem.*, **1981**, 256, 11804.
- 5) G. F. Ames, *J. Bacteriol.*, **1968**, 95, 833.
- 6) H. Itami, Y. Sakai, T. Shimamoto, H. Hama, M. Tsuda, T. Tsuchiya, *J. Biochem.*, **1989**, 105, 785.
- 7) 本田秀明, 斎藤卓也, 山口淳二, “両性界面活性剤による細胞骨格露出法”, 細胞, **1990**, 22(11), 451.
- 8) J. Yamaguchi, M. Shibano, T. Saito, *ICEM*, **1994**, 13, 43.
- 9) T. Matoh, J. Watanabe, E. Takahashi, *Plant Physiol.*, **1987**, 84, 173.