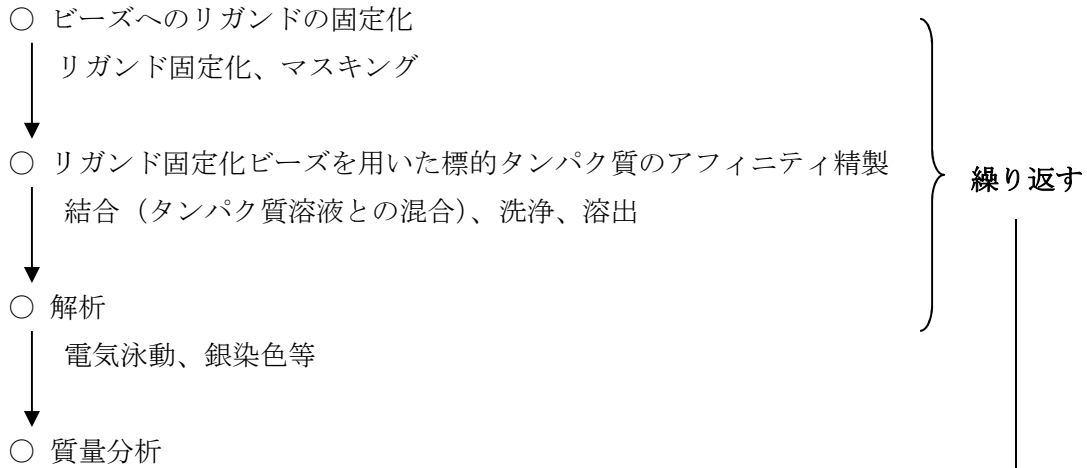


タンパク質精製条件検討の手順～困ったときには～

【標的タンパク質精製実験概略】



精製条件の検討

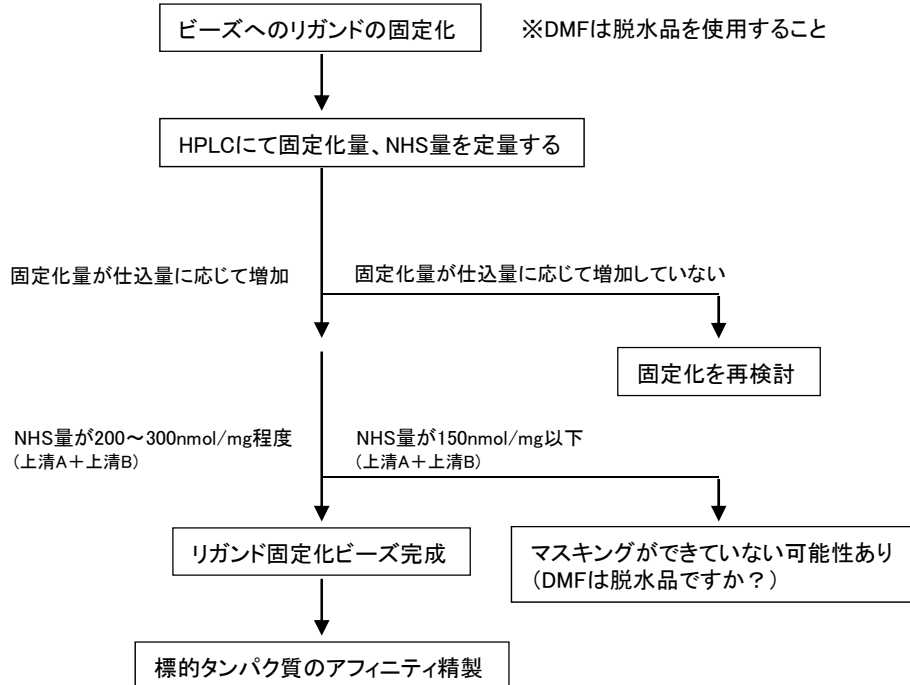
検討項目

- ・リガンド固定化量
- ・バッファー組成 (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、ドラッグエリユーション

【ビーズへのリガンドの固定化&固定化量の定量について】

① NHS beads へ NH₂ 基を有するリガンドを固定化した場合

HPLC（高速液体クロマトグラフィー）で固定化量の定量が可能です。



<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>

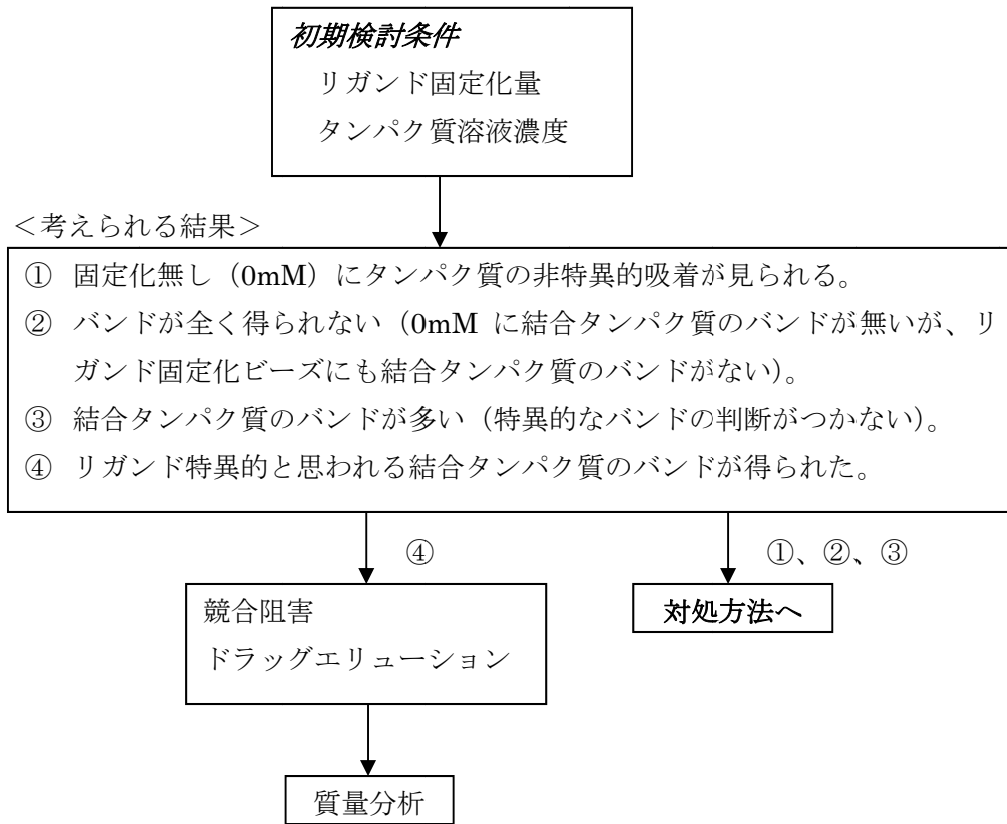
仕込濃度 (mM)	リガンド固定化量 (nmol/mg)									
	MTX	化合物 A	化合物 B	化合物 C	化合物 D	化合物 E	化合物 F	化合物 G	化合物 H	化合物 I
0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
0.1	4.0		10.9	3.6		10.3	7.6	29.2	10.6	13.7
0.2		19.7			21.0					
0.3	9.7		36.0	9.9		36.1	25.2	91.7	34.8	44.7
0.4		43.1								
0.8		92.2								
1	29.2		109.4	34.7	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、バッファー組成、タンパク質溶液の添加量によって異なります。

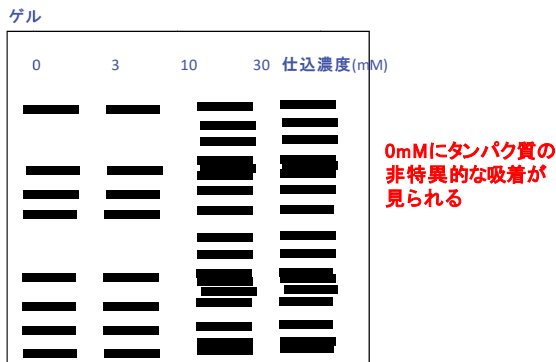
② 他のビーズの場合

HPLC での固定化量定量が出来ないので、結合実験を行い固定化量を定性的に評価します。

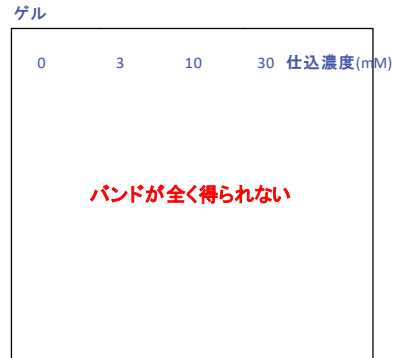
【タンパク質精製実験の結果】



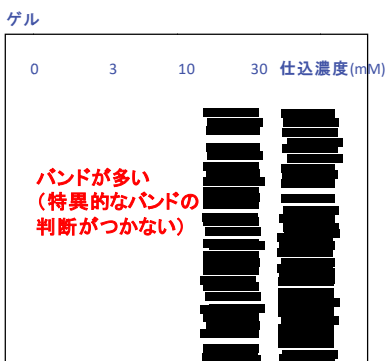
①検討が必要な例



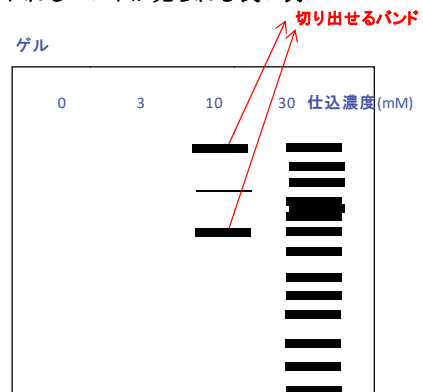
②検討が必要な例



③検討が必要な例



④特異的と思われるバンドが見られる良い例



【精製条件検討の方法】

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】

- ・ マスキングが不完全
- ・ 洗浄が不十分
- ・ 細胞抽出液の調製法が良くない

【対策】

- DMF は脱水品（モレキュラーシーブ）を使用する。
マスキング工程を確認、再度行う。
COOH beads を使用している場合、NHS 化工程を見直し、マスキングを再度行う。
- アフィニティ精製時の洗浄回数、量を増加させる。
- ビーズへ混合する前の細胞抽出液は必ず遠心分離（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
- ・ 固定化濃度が低い
- ・ 化合物と標的タンパク質の結合が弱い
- ・ 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

【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。
- 仕込濃度を増やす。
- バッファーの塩濃度を下げる。
- 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。

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
- ・ 化合物が疎水的でタンパク質が結合しやすい

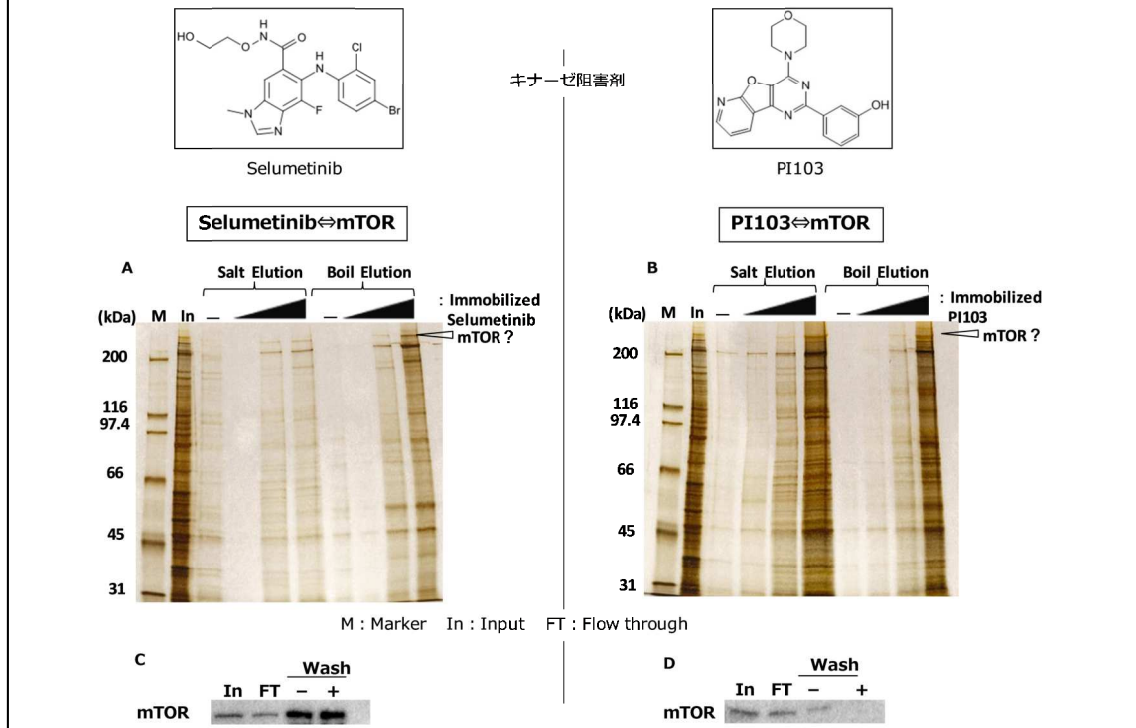
【対策】

- 固定化濃度を減らす。
- バッファーの塩濃度を上げる。
競合阻害、ドラッグエリミネーションを行う。

◎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、Wash を繰り返す（且つバッファー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があります。

◎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可能です！！

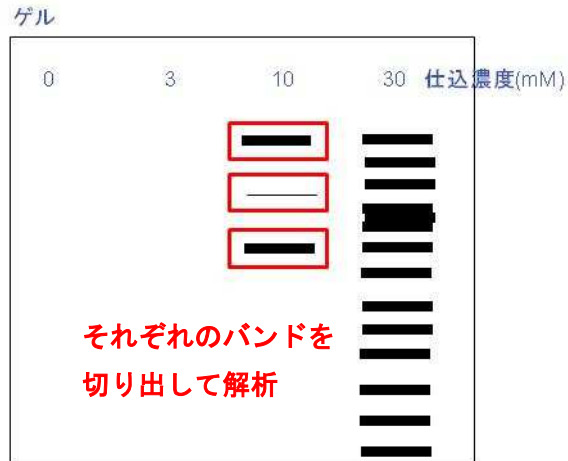
【アフィニティが弱いものはWashで外れる可能性があります】



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。

【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 ショットガン解析
 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。
 → バンドの数が多くとも解析可能！！（ゲルの切り出しを行わない）

