

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2004-155687

(P2004-155687A)

(43) 公開日 平成16年6月3日(2004.6.3)

(51) Int.Cl.⁷

C07K 1/28
G01N 27/447
// C12N 9/08

F I

C O 7 K 1/28
 G O 1 N 27/26 3 1 5 C
 G O 1 N 27/26 3 1 5 H
 G O 1 N 27/26 3 1 5 J
 C 1 2 N 9/08

テーマコード (参考)

4 B O 5 O
 4 H O 4 5

審査請求 未請求 請求項の数 6 O L (全 8 頁)

(21) 出願番号 特願2002-321331 (P2002-321331)
 (22) 出願日 平成14年11月5日 (2002.11.5)

(71) 出願人 501186173
 独立行政法人森林総合研究所
 茨城県つくば市松の里 1
 (74) 代理人 100085165
 弁理士 大内 康一
 (72) 発明者 高野 麻理子
 茨城県つくば市松の里 1 独立行政法人森
 林総合研究所内
 Fターム(参考) 4B050 CC07 DD01 FF11C FF13C LL03
 4H045 AA20 DA89 GA23 GA32

(54) 【発明の名称】 等電点電気泳動法によるタンパク質溶出方法。

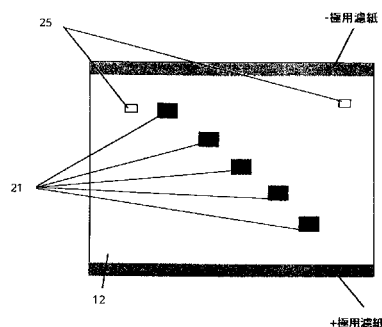
(57) 【要約】

【課題】 pH環境による影響を受けやすい酵素などの機能をもつタンパク質を回収時の pH環境を該酵素の pH安定領域に制御保持しつつ、酵素の機能を損なうことなく回収する。

【解決手段】 以下の工程からなるタンパク質溶出方法を実現して上記課題を解決する。

- (a) 両端に陰極および陽極の電極を設けた等電点電気泳動用ゲルの所定位置に孔部を形成する工程、
- (b) 前記孔部にタンパク質を捕捉するための吸着体を充填する工程、
- (c) 溶出しようとするタンパク質を含む試料を前記吸着体内にまたは吸着体に当接させる工程、
- (d) 前記ゲルに電場をかけ、前記吸着体の pH値を前記孔部の位置に対応するゲル上の pH勾配に応じた pH値となして試料中のタンパク質を溶出させるとともにこのタンパク質を前記吸着体に吸着させる工程、
- (e) 吸着体からタンパク質を回収する工程。

【選択図】 図3



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

以下の工程からなる等電点電気泳動法によるタンパク質溶出方法。

(a) 両端に陰極および陽極の電極を設けた等電点電気泳動用ゲルの所定位置に孔部を形成する工程、

(b) 前記孔部にタンパク質を捕捉するための吸着体を充填する工程、

(c) 溶出しようとするタンパク質を含む試料を前記吸着体内にまたは吸着体に当接させる工程、

(d) 前記ゲルに電場をかけ、前記吸着体の pH 値を前記孔部の位置に対応するゲル上の pH 勾配に応じた pH 値となして試料中のタンパク質を溶出させるとともにこのタンパク質を前記吸着体に吸着させる工程、

(e) 吸着体からタンパク質を回収する工程。

10

【請求項 2】

前記吸着体は緩衝液で平衡化したイオン交換体であることを特徴とする請求項 1 記載の等電点電気泳動法によるタンパク質溶出方法。

【請求項 3】

前記等電点電気泳動用ゲルは、両性担体を添加したものであることを特徴とする請求項 1 ないし 2 記載の等電点電気泳動法によるタンパク質溶出方法。

【請求項 4】

タンパク質を含む前記試料は、電気泳動によりゲル上に精製された単一のタンパク質を含むバンドの切片であることを特徴とする請求項 1 ないし 3 記載の等電点電気泳動法によるタンパク質溶出方法。

20

【請求項 5】

吸着体からのタンパク質の回収は、吸着体としてのイオン交換体に塩類を含む緩衝液を添加して、溶液状態でタンパク質を得るようにしたことを特徴とする請求項 2 ないし 4 記載の等電点電気泳動法によるタンパク質溶出方法。

【請求項 6】

請求項 5 において、タンパク質溶液から脱塩濃縮によりタンパク質を回収したことを特徴とする等電点電気泳動法によるタンパク質溶出方法。

【発明の詳細な説明】

30

【0001】**【発明の属する技術分野】**

本願発明は、等電点電気泳動による pH 勾配を利用した pH 制御下にタンパク質、特に pH 環境により機能に影響を受けやすい酵素類を pH 安定領域に保ちつつ溶出回収する技術に関するものである。

【0002】**【従来の技術】**

液体中に存在するタンパク質などの分子に電圧を加えると、分子の性質や形状に応じて + または - の電荷をもち、+ の電荷を有する分子は陰極方向に、また - の電荷を有する分子は陽極方向に移動する現象がある。この現象がいわゆる電気泳動であり、試料は緩衝液を含んだアクリルアミドゲルやアガロースゲル等の支持体に保持され、分子が電界の作用を受ける中で分離される。すなわち、試料中の成分の移動度の相違に基づき所要の分離がなされる。このような目的に供するため従来種々の装置類が提案されている。

40

例えば、図 7 は、タンパク質の溶出に用いられる従来の電気泳動溶出装置の構成を示す模式図である。

図において、1 は緩衝液で満たされる泳動槽で、陰極 2 a を有する陰極槽 2 と陽極 3 a を有する陽極槽 3 とからなっている。前記陰極槽 2 と陽極槽 3 との間には複数の連通管 4、4、4 が架設されていて、これら連通管 4、4、4 により前記陰極槽 2 と陽極槽 3 との間に流路が形成されている。

【0003】

50

そして、前記連通管 4 内に試料をセットして陰極 2 a および陽極 3 a 間に通電して試料から目的のタンパク質を溶出することになる。すなわち、図 7 において、5 は連通管 4 内に設置された載置網 6 に係止した試料としてのタンパク質を含むゲルであり、7 は試料としてのゲル 5 から緩衝液中に溶出され連通管 4 内を移動するタンパク質を捕捉採取するために連通管 4 の陽極槽 3 側の開口端に張設されたセロファン膜等の導電膜である。なお、図において、矢符は電流を示している。

【0004】

陰極 2 a と陽極 3 a 間に電圧をかけるとゲル 5 からタンパク質 8 が溶出されて連通管 4 内を陽極方向に移動し、前記セロファン膜 7 に当接して移動が遮断されその近傍に濃縮される。試料中のタンパク質は溶出されて移動するうちに、緩衝液中に拡散・希釈されるから高塩濃度溶液等を使用して回収する。

10

【0005】

【発明が解決しようとする課題】

ところで、酵素などの機能を有するタンパク質は周囲の pH 環境によって影響を受ける。

すなわち、酵素は機能を発現できる至適 pH 領域を持ち、至適 pH 領域外では機能を発現できない。また、pH 安定性も酵素の持つ特徴のひとつであって、酵素がその機能を維持できる pH 領域も各酵素に固有のものである。

pH 安定領域からはずれた pH 環境に酵素を晒すと酵素はその機能を失うこともある。したがって、酵素の機能を失わずにこれを回収するには、回収の際の pH を酵素の pH 安定領域内に維持する必要がある。しかしながら、上述の従来技術にあっては、泳動槽を満たす緩衝液の pH を自由に設定できないため、泳動用の緩衝液の pH (pH 8.0 - pH 9.0) 条件下で不安定な酵素はその活性を維持した状態での回収することが困難であった。

20

【0006】

【課題を解決するための手段】

本願発明は、

(a) 両端に陰極および陽極の電極を設けた等電点電気泳動用ゲルの所定位置に孔部を形成する工程、

(b) 前記孔部にタンパク質を捕捉するための吸着体を充填する工程、

(c) 溶出しようとするタンパク質を含む試料を前記吸着体内にまたは吸着体に当接させる工程、

30

(d) 前記ゲルに電場をかけ、前記吸着体の pH 値を前記孔部の位置に対応するゲル上の pH 勾配に応じた pH 値となして試料中のタンパク質を溶出させるとともにこのタンパク質を前記吸着体に吸着させる工程、

(e) 吸着体からタンパク質を回収する工程。

以上の工程からなる等電点電気泳動法によるタンパク質溶出方法を提供して上記従来の課題を解決しようとするものである。

【0007】

上記において、前記吸着体は緩衝液で平衡化したイオン交換体で構成することがある。

【0008】

また、上記において、前記等電点電気泳動用ゲルは、両性担体を添加したもので構成することがある。

40

【0009】

さらに、上記において、タンパク質を含む前記試料は電気泳動によりゲル上に精製された単一のタンパク質を含むバンドの切片となすことがある。

【0010】

またさらに、上記において、吸着体からのタンパク質の回収は、吸着体としてのイオン交換体に NaCl その他の塩類を含む緩衝液を添加して溶液状態でタンパク質を得るようになすことがある。

【0011】

50

そしてまた、上記において、タンパク質溶液から脱塩濃縮によりタンパク質を回収するようになることがある。

【 0 0 1 2 】

【 発明の実施形態 】

本願発明の要旨は、pH環境による影響を受けやすい酵素などの機能をもつタンパク質を回収時のpH環境を該酵素のpH安定領域に制御保持して酵素の機能を損なうことなく回収する点にあり、前記pHの制御は等電点電気泳動によって形成されるpH勾配を利用してなされる。

【 0 0 1 3 】

まず、タンパク質を含む試料を電気泳動用のゲルに添加し、図1に概略構成を示す電気泳動装置により電気泳動して単一のタンパク質を含むバンドに精製する。 10

図1において、11は、ゲル12の支持板で電圧印加時の冷却手段を兼ねている。13、13は、ゲル12の両端に設置された濾紙で電氣的インターフェースとしての電極液を含浸させてある。14、14は、前記濾紙13、13と電極を結ぶ導電線である。なお、矢符は電流方向を示している。

タンパク質を含む試料をゲル上の陰極側の近傍適宜箇所に濾紙小片を載置し、この小片に試料溶液を添加する。次いで、ゲルに電圧をかけて電気泳動を発生させ、タンパク質をそれぞれ単一のバンドに分離する。

【 0 0 1 4 】

次いで、分離した試料をゲルから切片として採取する。以降の手順を図2の参照下に説明する。図2は図1に示した電気泳動装置における泳動面の平面図であり、ゲル12は両性担体を添加した等電点電気泳動用のゲルであり図2(a)に示すように両極間に電場をかけることによりゲル上に所定範囲のpH勾配が形成される。さて、このゲル12表面において、所要のpHに応じた所定位置に図2(b)に示すように長方形の孔部21を形成する。 20

なお、孔部21において、泳動方向(図で水平方向)の長さが過大であるとpH勾配の作製に影響をおよぼすので、前記長さは、好ましくはゲル長さ(泳動方向)の1/10未満に設定する。

【 0 0 1 5 】

次に、タンパク質の吸着体として緩衝液で平衡化したイオン交換体22を準備して、前記孔部21に充填する。このイオン交換体22は、電場をかけた場合にゲル12上に作製されるpH勾配上において孔部21の位置に対応するpHに制御されることとなる。したがって、緩衝液で平衡処理をなすにあたってはそれに近いpHの緩衝液の使用が望ましい。吸着体としてのイオン交換体としては、イオン交換樹脂、イオン交換セルロース、イオン交換セファロース、イオン交換セファデックス等の周知のものを使用できるが、親水性に優れタンパク質、核酸、多糖類などの吸着に好適なイオン交換セルロース、イオン交換セファロース等の採用が望ましい。 30

なお、イオン交換体には陰イオン交換体と陽イオン交換体があり、前者は平衡化されたpHより低い値のpI(pH)のタンパク質を吸着する一方、後者は逆に平衡化されたpHより高いpI(pH)のタンパク質を吸着する。このような観点において、吸着体は、 40

【 0 0 1 6 】

次に、孔部21に充填したイオン交換体22内に試料23を載置添加する(図2(c))。試料23の位置は回収に支障がなければイオン交換体22内部に限定されない。以上の状態で、ゲル12に適合する条件で電圧をかけて、タンパク質24を溶出してイオン交換体22に吸着させる。吸着したタンパク質は溶液化して脱塩濃縮する等、通常の方法で回収する。

【 0 0 1 7 】

【 発明の実施例 】

次に、イオン交換体のpH制御の実証試験、タンパク質吸着等の実証試験ならびにこれら 50

に基づく本願発明の1実施例を説明する。

実験1 (図3、図4参照)

使用した電気泳動装置: Multiphor II Electrophoresis System (ファルマシア社商標)

ゲル: Ampholine PAG Plate pH 3.5 - 9.5 (ファルマシア社商標)

イオン交換体: DEAE Sepharose Fast flow (ファルマシア社商標)

pIマーカー: Broad pI Kit, pH 3.5 - 9.3 (ファルマシア社商標)

10

1. 装置の冷却板に絶縁用のケロシンを滴下し、ゲルをサポートフィルムごと設置した。

2. 陰極用濾紙に1Mグリシン溶液、陽極用濾紙に1Mリン酸溶液をしみこませゲルの両端にセットした。

3. 図3に示すように両極間をほぼゲル12を6等分する位置の5箇所に長方形の孔部21 (たて7mm × 横1cm) を形成した。

4. 孔部21にイオン交換体を間隙なく充填した。

このイオン交換体は、10mM酢酸緩衝液pH5.5で平衡化して自然沈降させ、上澄み部分を除いたややゆるめのペースト状に調整した。

5. ゲル12上で図示の位置に、ゲルに作製されるpH勾配の視覚的確認のため、pIマーカー25, 25を濾紙を用いて添加した。

20

6. 使用したゲル12に適した条件 (1400V, 25mA, 35W) で1時間通電した。

7. 前記の電気泳動後、各孔部21のイオン交換体を回収しそれらのpH値をpHメーターで測定した。

その結果、図4に示すように孔部21に充填したイオン交換体 (図中白線囲み部分) のpH値は陰極からの距離に応じて変化し、pIマーカーで示されたpHの値とほぼ一致する。したがって、予めpIマーカーでゲル上の位置ごとのpH値がわかっているならば、孔部21の形成位置によりイオン交換体のpHの設定すなわちpH制御が可能であることが確認される。

30

【0018】

実験2 (図5参照)

ゲル、イオン交換体その他の試薬類および装置は前記実験1と同様のものを使用した。

1. ゲルを設置し孔部21を形成して、イオン交換体を充填するまでの工程は前記実験1と同様である。

2. 陰極から1.5cmの位置に5mm × 5mmの濾紙をセットし、これにpIマーカーを添加した。

3. また、イオン交換体上に5mm × 5mmの濾紙をセットしこれにpIマーカーを添加した。

4. 以上の状態で前記実験1と同様の条件下に、40分間の電気泳動をなした。

40

5. ゲルからイオン交換体を除去し、ゲルをクマシブルーR250染色液で染色した。以上において、イオン交換体のない位置に添加したpIマーカーでは、含まれている全てのタンパク質のバンドが検出された。一方、イオン交換体の上に添加したpIマーカーにあっては、イオン交換体に吸着されない孔部の位置より陰極側のタンパク質のバンドは全て検出されたが、イオン交換体に吸着される陽極側のタンパク質はゲル中にバンドが形成されなかった。通常、陰イオン交換体は平衡化されたpHよりpI (等電点) の低いタンパク質を吸着する。該実験においても、ゲルに作製されるpHによってイオン交換体が平衡化されたpH以下のpIのタンパク質が吸着されることが確認された。

【0019】

実施例1 (図6参照)

50

1. 部分精製したマンガンペルオキシダーゼアイソザイム 4 個を含む試料を、等電点電気泳動によって 4 本のバンドに分離し、これら各バンドをゲルから切り取りゲル切片を得た。

2. 前記実験 1, 2 と同様に装置にゲルを設置して pH 5.5 - 6.0 となる位置に 4 個の孔部を形成しイオン交換体を充填して、これらの各イオン交換体内に前記ゲル切片を添加し前記実験 2 と同様に電気泳動溶出を実行した。

3. 泳動後、各孔部からイオン交換体を回収した。

4. 回収したイオン交換体に 0.5 M 塩化ナトリウムを含む 10 mM 酢酸緩衝液 pH 5.5 を 2 ml 加え、攪拌後、濾過してタンパク質を溶出した。なお、溶出液は脱塩濃縮して 5 μ l とした。

10

以上、図 6 に示すように、回収されたタンパク質の等電点電気泳動結果より、各タンパク質は始めに精製されたのと同じ位置に単一のバンドとなって検出された。

したがって、4 つのマンガンペルオキシダーゼアイソザイムはいずれも、ゲル切片から各イオン交換樹脂に溶出吸着されたことが確認できる。したがって、電気泳動試料の前記ゲル切片からタンパク質の溶出、回収が可能であることが確認できた。

【0020】

【発明の効果】

本願発明は、以上説明したように、等電点電気泳動によって形成される pH 勾配を介して pH 制御されたイオン交換体にタンパク質を溶出するようにしたので、タンパク質、特に酵素等の機能や特性を損なうことなくそれらの溶出回収が可能になった。

20

【図面の簡単な説明】

【図 1】実施例に係る電気泳動装置の概略構成図である。

【図 2】図 1 に示す装置における泳動面の平面図である。

【図 3】電気泳動装置のゲル上に形成した孔部を示す平面図である。

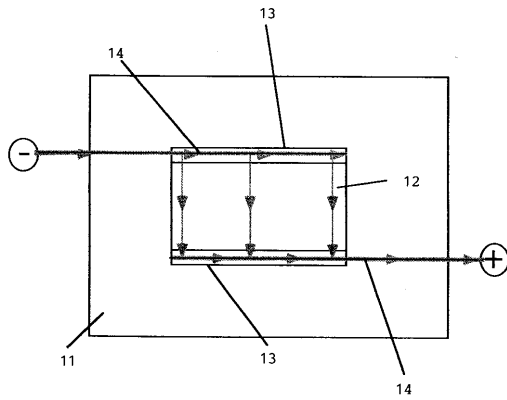
【図 4】図 3 の設定状態で電気泳動をなした後の各孔部におけるイオン交換体の実測 pH と陰極からの距離との相関関係を示すゲル平面図である。

【図 5】等電点電気泳動ゲル上での pI マーカーの電気溶出結果を示す平面図である。

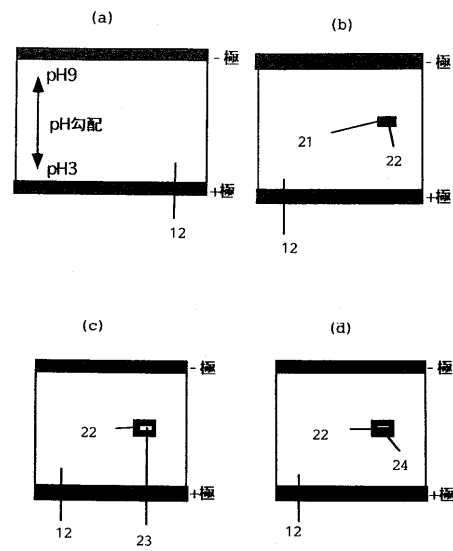
【図 6】第 1 実施例に係るタンパク質の回収結果を示すゲル平面図である。

【図 7】従来技術の説明図である。

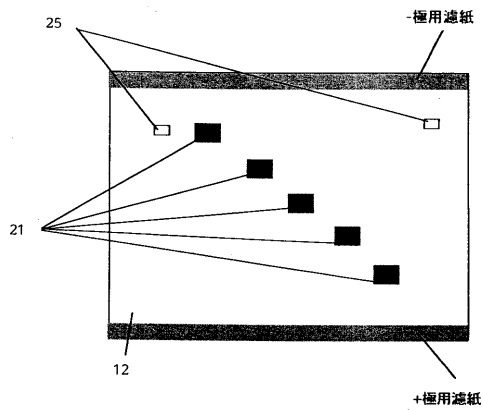
【図 1】



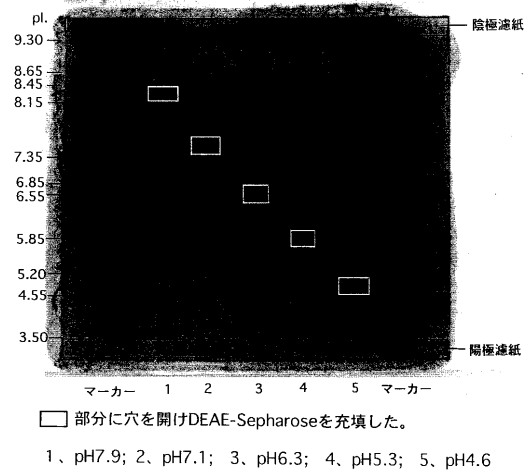
【図 2】



【図 3】



【図 4】



【 図 5 】

