

分子マトリクス電気泳動の開発とアフィニティ電気泳動への応用

亀山 昭彦

独立行政法人 産業技術総合研究所

はじめに

ムチンは上皮細胞などが産生する高粘性の糖タンパク質群であり、その糖鎖構造の変化は古くから腫瘍との関連性が報告されてきた。近年、プロテオミクス技術の成熟に伴い、多数の臨床試料のプロテオームから疾患関連タンパク質マーカーを探索する研究が活発になされてきたが、ムチンがこれらの研究から見出されることは少ない。ムチンは数 MDa にも及ぶ巨大タンパク質であり、また、その 50～80% を占める糖鎖がプロテアーゼ限定分解を阻むからである。そこで私たちはムチンに特化した新たな簡便分析法の開発を進め、ここに紹介する分子マトリクス電気泳動法に至った。

分子マトリクス電気泳動法 (SMME)

SMME は多孔性ポリマー膜に含浸させた親水性ポリマーを分離担体とする膜電気泳動であり、セルロースアセテート (セ・ア) 膜電気泳動に類似した方法である(1)。演者らは通常、多孔性ポリマー膜として PVDF 膜、親水性ポリマーとしてポリビニルアルコールを用いている。セ・ア膜電気泳動との違いは、化学的に極めて安定で疎水結合力の強い PVDF を用いているため、化学的糖鎖遊離処理において糖鎖分析を妨害する物質 (セルロース由来のグルコース断片など) を生じないことや、泳動後の膜上に存在するタンパク質を別の膜に転写することなく抗体やレクチン等で染色することが可能である点にある(2)。この手法を用いて、演者らは新たな疾患バイオマーカーを見出すことを目的として、膵臓疾患患者の膵液・胆汁中のムチンを調べる研究を進めている。

アフィニティ電気泳動への展開

PVDF 膜はウェスタンブロットに使われる膜である。その疎水結合力の強さを活用するとアフィニティ電気泳動に SMME を応用することができる。すなわ

ち、タンパク質や脂質など疎水的に結合できる物質をあらかじめ PVDF 膜へ吸着させておき、その後で親水性ポリマーを含浸させることにより、容易にアフィニティ電気泳動用の分離担体を作成することができる。この膜を用いた電気泳動では、あらかじめ吸着させた分子と相互作用する分子の移動速度が遅れる。この手法をアフィニティ SMME と名付けた(3)。演者らは、この手法を糖鎖と糖鎖認識分子間の弱い結合の検出に利用することを考えている。本シンポジウムでは、各種レクチン、糖脂質、抗体などを PVDF 膜に吸着させてアフィニティ電気泳動を行った例を紹介したい。

今後の展望

ここに紹介した SMME やアフィニティ SMME は誕生して間もない技術であり、基礎的な部分にもまだまだ解明すべき点や改良の余地がある。一方で、セ・ア膜電気泳動と同様に誰でも手軽に実施できるという点は本手法の特長の一つであり、関心のある方は気軽に活用していただきたい。最近のタンパク質バイオマーカー探索において、あるタンパク質の有無や量的変化だけではなく、そこに結合している糖鎖の違いに着目したいいわゆる糖鎖バイオマーカーの可能性が、最近、次々と報告されている。肝がんの診断マーカーとして広く知られる AFP-L3 分画も、糖鎖バイオマーカーである。SMME はムチンを分析する目的で誕生した手法だが、ムチンのみならずリポ蛋白質や M タンパク、さらにはこれから見つかる糖鎖バイオマーカーなどの分析に活用できるように研究を展開したいと考えている。

文献

- (1) Matsuno YK, Saito T, Gotoh M, Narimatsu H, Kameyama A. *Anal. Chem.* 2009;81(10):3816-23.
- (2) Matsuno YK, Dong W, Yokoyama S, Yonezawa S, Saito T, Gotoh M, Narimatsu H, Kameyama A. *Electrophoresis.* 2011;32(14):1829-36.
- (3) Matsuno YK, Dong W, Ikehara Y, Narimatsu H, Kameyama A. *submitted.*