

タンパク質実験ノート

下 タンパク質をしらべよう (機能解析編)

contents

第1章 タンパク質の機能解析の進め方

岡田雅人 14

第2章 電気泳動によるタンパク質の分離同定

| | | |
|--|------------|----|
| I ポリアクリルアミドゲル電気泳動 | 奥村宣明 | 17 |
| I-1 SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) | | 17 |
| SDS-PAGE | | |
| I-2 タンパク質の染色 | | 23 |
| ① CBB染色 ② 銀染色 ③ SYPRO Ruby染色 | | |
| I-3 そのほかの電気泳動法 | | 29 |
| II ウェスタンブロッティング | 奥村宣明 | 31 |
| II-1 タンパク質のメンブレンへの転写とPonceau S染色 | | 31 |
| ① セミドライ式によるブロッティング | | |
| ② タンク式ブロッティングの場合 | 吉川由利子 岡田雅人 | |
| II-2 抗体との反応と抗原の検出 | | 36 |
| ① ブロッキングと抗体との反応 ② HRP反応による抗原の検出—DAB法 | | |
| ③ HRP反応による抗原の検出—化学発光法 ④ アルカリホスファターゼ反応による抗原の検出 | | |
| II-3 バンドの定量 | | 42 |
| ① プロットの画像化とバンドの定量 ② その他の定量法 ③ 参考：デジタル画像の基礎知識 | | |
| III 等電点電気泳動と二次元電気泳動 | 奥村宣明 | 45 |
| III-1 二次元電気泳動とプロテオーム解析 | | 45 |
| III-2 2種類の等電点電気泳動法：CA-IEFとIPG-IEF | | 45 |
| III-3 IPG-IEFを用いた二次元電気泳動 | | 46 |
| ① 一次元目：IPG-IEF ② 二次元目：SDS-PAGE ③ タンパク質の染色法、解析法 | | |
| III-4 CA-IEFを用いた二次元電気泳動 | | 51 |



| | | |
|--|------|----|
| IV 質量分析によるタンパク質同定法 | 齊藤一伸 | 56 |
| IV-1 解析の進め方 | | 56 |
| IV-2 プロテアーゼによるゲル内消化 (In gel digestion) | | 57 |
| IV-3 サンプルの脱塩・濃縮 | | 61 |
| V SDS-PAGEにより分離されたタンパク質の回収法 | 宮崎 香 | 65 |
| V-1 拡散法による抽出法 | | 66 |
| V-2 電気泳動溶出法 | | 69 |
| V-3 調製用電気泳動装置 | | 70 |

第3章 抗体を用いたタンパク質の分離と分析

| | | |
|--|------------|-----|
| I 抗体に関する基礎知識と抗体の作製法 | 宮崎 香 | 73 |
| I-1 抗体に関する基礎知識 | | 73 |
| ① 抗体分子の構造と特徴 ② 抗体の反応性 ③ 抗体の用途と選択 | | |
| I-2 抗体の作製法 | | 75 |
| II 抗体カラムによるタンパク質の精製 | 宮崎 香 小柳 潤 | 78 |
| II-1 実験操作の概略 | | 78 |
| ① 抗体の選択と精製 ② 抗体カラム ③ 抗原タンパク質の精製 | | |
| II-2 抗体の精製 | | 80 |
| II-3 抗体カラムの作製 | | 81 |
| II-4 抗体アフィニティークロマトグラフィーの操作法—抗ラミニン α 3モノクローナル 抗体カラムを用いたラミニン332の精製 | | 83 |
| III 免疫沈降法 | 山本和博 東 昌市 | 87 |
| III-1 一般的方法と原理 | | 87 |
| ① モノクローナル抗体を用いる場合 ② ポリクローナル抗体を用いる場合 ③ プロテインA, プロテインG, および二次抗体 ④ 抗原-抗体反応の条件 ⑤ 溶出条件 ⑥ 一般的な操作 | | |
| III-2 免疫沈降法を用いた細胞膜表層タンパク質の検出 —大腸癌細胞における細胞表層のE-カドヘリンの検出 | | 90 |
| IV 免疫染色法 | 森山佳谷乃 宮崎 香 | 95 |
| IV-1 主な実験条件 | | 95 |
| ① 検出法の選択 ② 抗体の選択 ③ 標本の作製 ④ その他 | | |
| IV-2 ホルマリン固定・パラフィン切片の染色 | | 98 |
| IV-3 凍結切片の染色 | | 103 |
| IV-4 培養細胞の蛍光染色 | | 105 |
| ① 接着培養細胞の蛍光染色 ② 浮遊細胞の場合 | | |
| V ELISAによる特定タンパク質の定量とタンパク質間相互作用の分析 | 森山佳谷乃 宮崎 香 | 109 |
| V-1 ELISAの原理 | | 109 |
| ① 直接吸着法 ② サンドイッチ法 ③ 競合法 ④ タンパク質間相互作用分析と細胞ELISA (細胞を用いた受容体分析) | | |
| V-2 標準曲線 (スタンダードカーブ) | | 111 |
| V-3 サンドイッチ ELISA法を用いた特定タンパク質の検出 | | 112 |

第4章 タンパク質相互作用の解析

| | | |
|-----------|--|---------------|
| I | タンパク質間相互作用の検出 | 117 |
| I-1 | 生化学的解析 | 117 |
| | ① GST/MBP プルダウン | 林 達也 三木裕明 |
| | ② 共免疫沈降 | 船戸洋佑 三木裕明 |
| | ③ ファーウエスタン | 上杉加奈美 三木裕明 |
| | ④ Blue Native PAGE | 林 達也 三木裕明 |
| | ⑤ ゲル濾過によるタンパク質複合体の検出 | 船戸洋佑 三木裕明 |
| I-2 | 表面プラズモン共鳴法 | 寒川 剛 高木淳一 132 |
| | ① リガンドの固定化 ② 再生条件の検討 ③ 測定 ④ データ処理 | |
| I-3 | Two-hybrid法 | 伊東文祥 138 |
| | ① Two-hybrid法の原理と基礎知識 ② Two-hybrid法の実際 | |
| II | 蛍光タンパク質を用いた解析 | 144 |
| II-1 | 蛍光融合タンパク質を用いた細胞内局在・共局在の解析 | 片山博幸 宮脇敦史 144 |
| II-2 | FRETによるタンパク質間相互作用解析 | 下園 哲 宮脇敦史 149 |
| | ① 実験法の目的 ② 原理 ③ 蛍光タンパク質を用いたFRET | |

第5章 タンパク質修飾の解析

| | | |
|------------|--|---------------------------|
| I | リン酸化 | 岡田雅人 155 |
| I-1 | リン酸化の検出 | 156 |
| | ① リン酸化部位推測プログラムでの検討 ② 抗体を用いたリン酸化の検出法 | |
| | ③ 間接的なリン酸化検出法 ④ ラジオアイソトープ (RI) [³² P] 標識によるリン酸化検出法 | |
| I-2 | リン酸化部位の同定 | 166 |
| | ① 質量分析計による同定 ② 部位特異的変異体などを用いた解析 | |
| I-3 | リン酸化の生理的意義の解析 | 166 |
| | ① リン酸化部位特異的抗体の作製 ② 生理活性や相互作用への影響の解析 | |
| | ③ キナーゼ阻害剤を用いた解析 ④ 部位特異的変異体を用いた解析 | |
| II | ユビキチン化・タンパク質分解 | 佐野宗一 岩井一宏 172 |
| II-1 | ユビキチン化タンパク質の検出 | 173 |
| II-2 | <i>in vitro</i> ポリユビキチンアッセイ | 176 |
| II-3 | ポリユビキチン鎖のタイプの決定 | 177 |
| II-4 | タンパク質分解 | 179 |
| III | アセチル化・メチル化 | 木村博信 田嶋正二 181 |
| III-1 | 原理 | 182 |
| III-2 | クロマチン免疫沈降法 (ChIP) | 183 |
| IV | 糖鎖修飾 | 相川京子 中野佑妃子 斎藤多佳子 松本勲武 189 |
| IV-1 | レクチンを用いた解析 | 189 |
| | ① プロット膜でのレクチン染色 ② 蛍光レクチン染色 | |



| | |
|--|-----|
| IV-2 N結合型糖鎖の酵素消化 | 193 |
| V 質量分析によるタンパク質修飾の解析法 齊藤一伸 | 196 |
| V-1 質量分析によるタンパク質修飾解析の基礎知識 | 196 |
| V-2 主なタンパク質修飾の質量分析による解析 | 197 |
| ① リン酸化 ② ユビキチン化 ③ アセチル化・メチル化 ④ 糖鎖修飾 ⑤ 脂質修飾 | |
| V-3 翻訳後修飾の予測とデータベース | 199 |
| VI タンパク質酸化修飾の解析 三木裕明 | 201 |
| VI-1 ジスルフィド (S-S) 結合の検出 | 201 |
| ① S-S結合の性質 ② 非還元SDS-PAGEによるS-S結合の解析 | |
| VI-2 細胞内S-S結合タンパク質の網羅的探索 | 203 |
| ① 細胞内でのS-S結合の還元的切断反応とその利用 | |
| ② TRX変異体を利用したS-S結合タンパク質の網羅的探索 | |
| VI-3 ROS検出プローブを用いた解析 | 205 |
| ● 付録 後藤直久 | 207 |
| 1. 有用なインターネットサイトの紹介 2. 主な試薬の分子量 3. タンパク質分子量早見表 | |
| ● 本書で調製する試薬類・バッファー・培地の一覧 | 212 |
| ● 索引 | 213 |

本書上巻「タンパク質をとり出そう（抽出・精製・発現編）」掲載項目一覧

第1章 タンパク質実験の進め方

第2章 タンパク質の基本的な実験操作

- I バッファーの調製法
- II タンパク質の安定化
- III タンパク質の定量法

第3章 タンパク質の抽出法

- I 細胞の破碎と分画
 - I-1 動物組織
 - I-2 培養細胞
 - I-3 酵母
 - I-4 植物
- II タンパク質の可溶化法

第4章 タンパク質の分離精製法

- I 精製の組み立て方
- II 硫安分画, 濃縮, 脱塩操作
- III 低圧クロマトグラフィーの基本操作
- IV 中高压液体クロマトグラフィーの基本操作 (FPLC, HPLCなどの利用)

- V イオン交換クロマトグラフィー
- VI ゲル濾過クロマトグラフィー
- VII アフィニティークロマトグラフィー
- VIII 逆相クロマトグラフィー

第5章 遺伝子組換えタンパク質の発現と精製

- I 大腸菌による融合タンパク質の発現と精製
 - I-1 Hisタグタンパク質の発現と精製
 - I-2 GST融合タンパク質の発現と精製
 - I-3 その他のタグ・融合タンパク質・蛍光タンパク質とタグ除去用のプロテアーゼ
 - I-4 封入体からの活性再生法
 - I-5 アルギニン法による組換えタンパク質の再生方法
- II 動物細胞での遺伝子導入組換えタンパク質の発現
- III 無細胞タンパク質合成系
- IV 高次構造解析のためのタンパク質の調製
 - IV-1 X線結晶構造解析のためのタンパク質調製法
 - IV-2 NMR解析のためのタンパク質調製法