

## ゲルアッセイの解析方法

反応キットを用いて S-パルミトイル化修飾を MfTag に変換した後、**非還元条件下**で SDS-PAGE をおこない、目的タンパク質に対する抗体でウェスタンブロットをすることで、目的タンパク質の S-パルミトイル基の個数を推定することができます。個数判定にあたり下記判定方法をご参照ください。

### 【判定方法】

#### 1) 特異性の判断

図 1 のように **-/-** が目的タンパク質の基準バンドになります。図 1 左のように **-/+** に追加のバンドが見られず、**+/+** にのみ追加のバンドが見られた場合、パルミトイル基を特異的に検出できたと判断できます。もし図 1 右のように **-/+** にも追加のバンドが観察された場合、フリーシステインのブロッキング不十分であることを指し、個数の判定は注意が必要です。

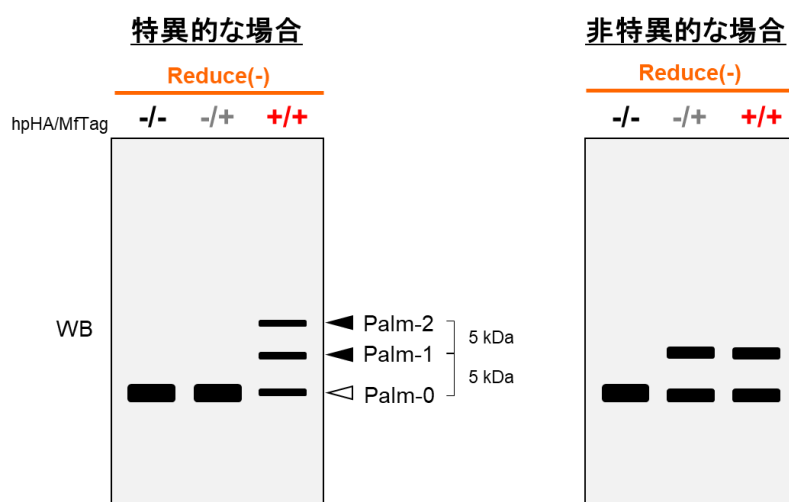


図 1 ゲルシフトアッセイの特異性の判断方法

#### 2) 各シフトバンドの評価方法

MfTag の分子量は約 5 kDa で、MfTag の導入個数  $n$  の場合、バンドはオリジナルバンド+標識バンドで 最大  $(n+1)$  本になります。しかし、特定の個数の MfTag 修飾体が存在しないなど、個数が不鮮明場合があります。その場合、分子量マーカーの SDS-PAGE における移動度と分子量の指数関数プロットを作製し、バンドシフトの移動度を比較することで、MfTag によりシフトしたバンドが MfTag 何個分に相当するか検討することができます。

## 実施例 Ras GTPase ファミリー Hras と Rap2b の解析

Ras 低分子量 G タンパク質ファミリーである Hras と Rap2b は、多くの研究報告より C 末端の 2 カ所でパルミトイル化されることが知られています。マウス脳組織における Hras と Rap2b の解析を行いました。Hras(図 2 緑色)は **+/+** 特異的にオリジナルバンドに加えて 2 本のバンドが新たに現れ、計 3 本のバンドが確認できます。この結果は、Hras が 2 カ所パルミトイル化されることを示しています。一方、Rap2b(図 2 ピンク色)は **+/+** 特異的に高分子量側でバンドが 1 本のみ観察されました。それぞれバンドの移動度から Rap2b の MfTag 標識個数を解析します。

まず、各分子量マーカのゲル移動度 Rf を測定し、分子量とゲル移動度のプロットを作製後、指数関数近似式でフィッティングして近似式を算出します。次いで、**+/+** の各バンドの移動度を測定し、近似式を用いて見かけの分子量を算出します。もし **+/+** のオリジナルバンドが消失している場合、**-/-** または **-/+** のバンドを代用してください。これにより、各バンド間の分子量差が推定できます。MfTag は約 5 kDa ですが、タンパク質の種類や標識個数、2 つ以上の MfTag の近接度合いなどによって 4-7kDa 程度のばらつきが生じる場合があります。Hras はそれぞれ約 5 kDa のシフトが確認できたことからそれぞれ MfTag が 1 個、2 個標識されたものと判定できます。Rap2b はオリジナルバンドに対し約 11 kDa のシフトが見られたことから、観察されたバンドは MfTag が 2 個標識されたものであることが分かります。この結果より Rap2b はマウス脳において、ほぼ全量が 2 カ所パルミトイル化されていることを示唆しています。

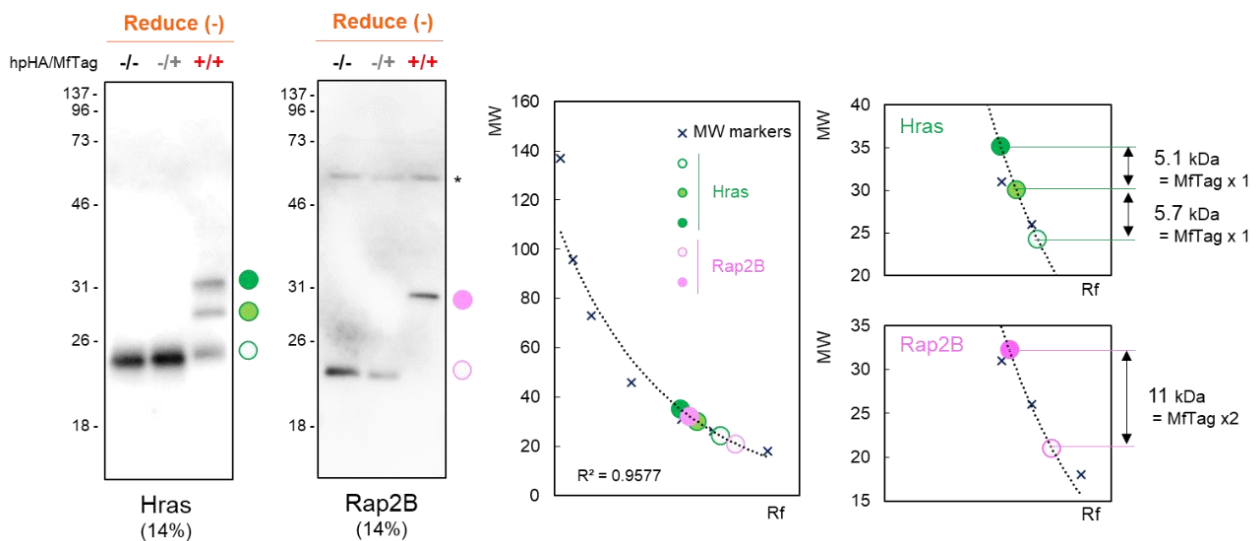


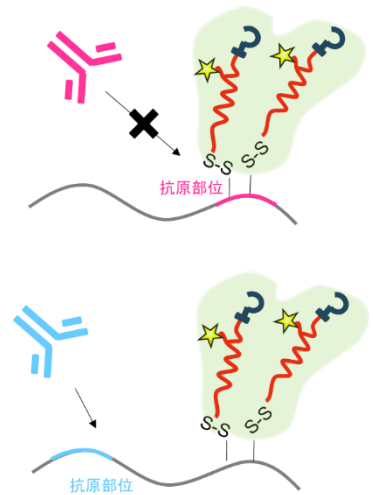
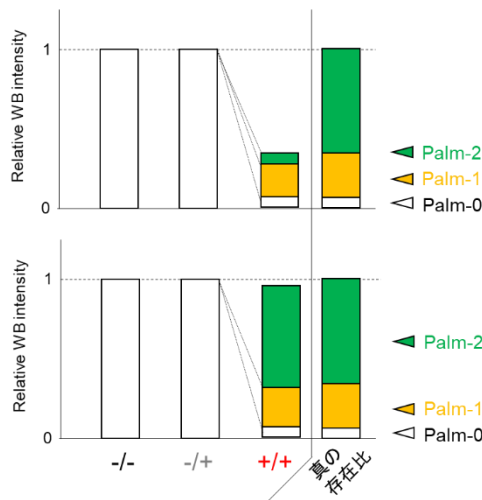
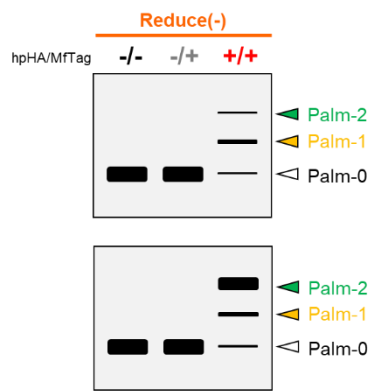
図 2 マウス脳組織における Hras と Rap2b の MfTag 標識個数の判定

\*抗体自体の非特異的検出バンド

### 3) MfTag 標識による使用する抗体反応への影響評価

MfTag 標識による抗体抗原反応が無標識に比べて変化する可能性がありますので、ゲルシフトアッセイでは MfTag 標識数(パルミチル基の個数)は評価できますが各バンド間の定量はできません。例えば、図3では抗原が MfTag 標識部位と重なるケース(上段)と重ならないケース(下段)を示しています。抗原が MfTag 標識部位と重なる場合、著しく認識能力が低下する可能性があり、**+/+** の各バンドの強度をすべて加算しても **-/-** のバンド強度に達しないことがあります。このケースでは、各バンドの強度で比を取ると誤った存在比を与える危険性がありますので、ゲルシフトアッセイは MfTag 標識個数の判定にとどめ、バンド間の定量は行わないことを推奨しています。

#### 抗原抗体反応に影響が大きい場合



#### 抗原抗体反応に影響が小さい場合

図3 MfTag による抗原抗体反応に与える影響