



プロテオーム解析による抗原抗体反応の特異性の確認

大飼美香・奥村美那・北山智歩・田中佑樹・密山晃代(藤島高等学校2年)

要約:「SPP(サイエンス・パートナーシップ・プロジェクト)、免疫の驚異を学ぶ実験講座」において、免疫についての講義の後、抗原抗体反応を利用して蛍光させたマウスの胸腺・脾臓のT細胞・B細胞の観察、オクタロニー寒天内拡散法によって不溶性になった抗原抗体複合体の沈降反応を観察し、抗原抗体反応を確かめた。

その後、抗原抗体反応の特異性(ある抗原Aに反応する抗体Bは、その他の抗原とは反応しない特異性の高い認識のこと)を確認するため、プロテオーム解析を用い、オクタロニーの寒天中のタンパク質を田中耕一博士の考案した質量分析装置によって特定した。

オクタロニー法(抗原抗体複合体の沈降反応観察)

原理

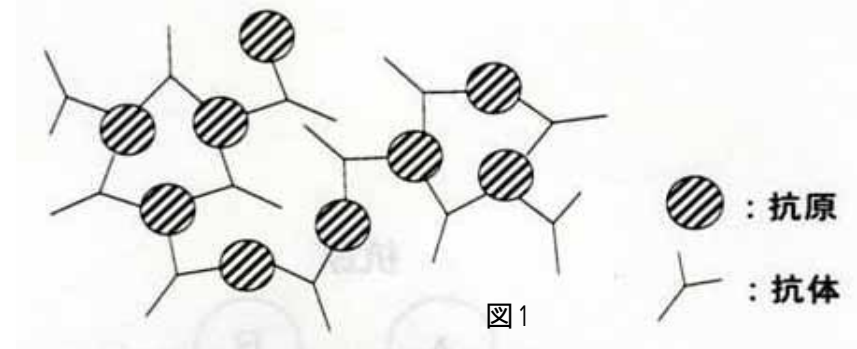
オクタロニー法は、抗原も抗体も含まないゲル層をガラス板上につくり、それに穴を開けて抗原や抗体を満たし、ゲル層内に拡散させて反応させる《二次元免疫拡散法》の代表的な方法である。ゲル内で、抗原と抗体を拡散・接触させて免疫複合体を形成させ、その複合体が不溶性の沈降反応線として可視されるのを観察する。

沈降反応

抗原分子は、複数の抗原決定基をもち、抗体は2個の抗原結合部位を持つので大きな格子状の結合物(図1)を作り、不溶性となり沈殿すること。

ゲル内沈降反応

ゲル内で抗原に抗体を反応させ、沈降反応による沈降物の生成の模様を観察し、抗原や抗体の純度、含まれる抗原抗体反応数を知る方法。



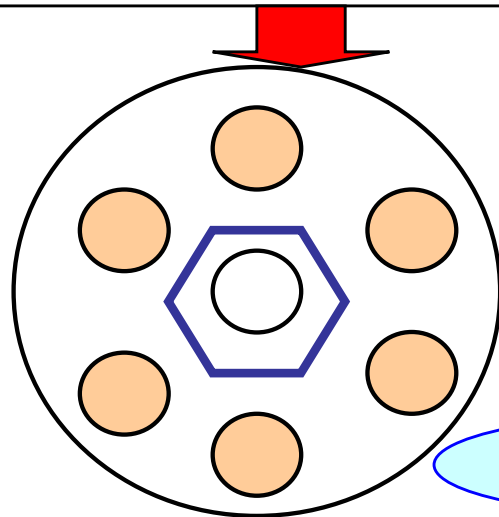
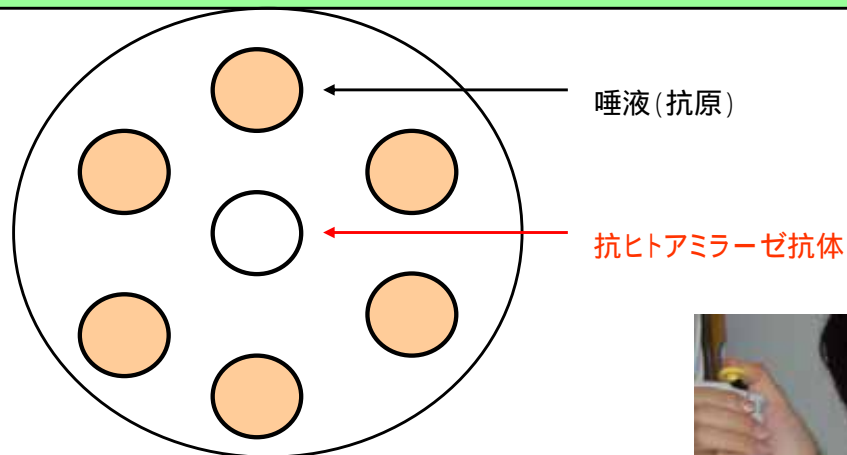
実験

準備した抗原 唾液(ヒト)、全血液(ヒト)、血漿(マウス、ヒツジ)、赤血球溶血液(マウス、ヒツジ)

アルブミン(ヒト)、ヘモグロビン(ヒト)

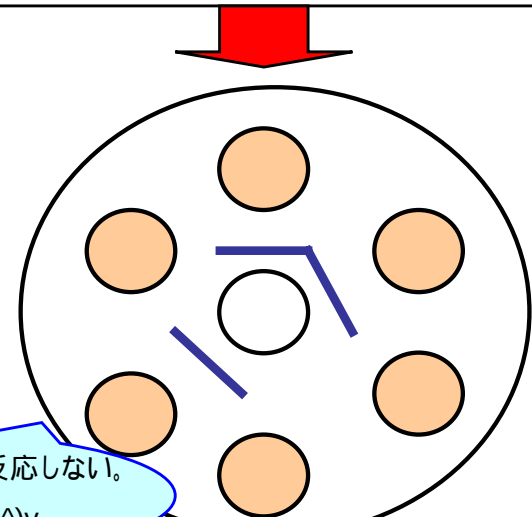
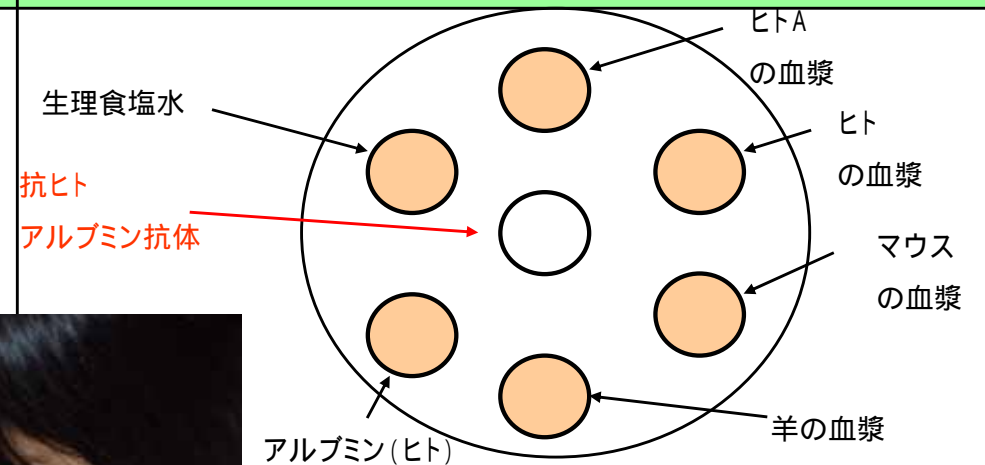
// 抗体 抗ヒトアミラーゼ、抗ヒトアルブミン、抗ヒトヘモグロビン

唾液中のアミラーゼ



沈降線は丸くないんだ！

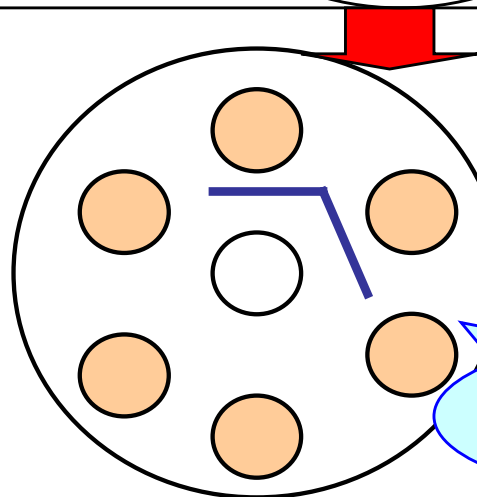
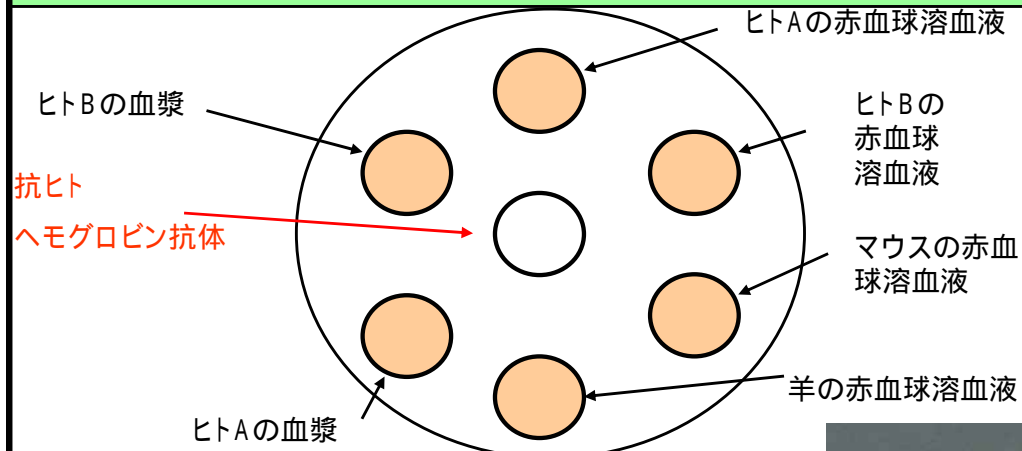
血漿中のアルブミン



やっぱりヒトにしか反応しない。
予想通りでした。(^^)v



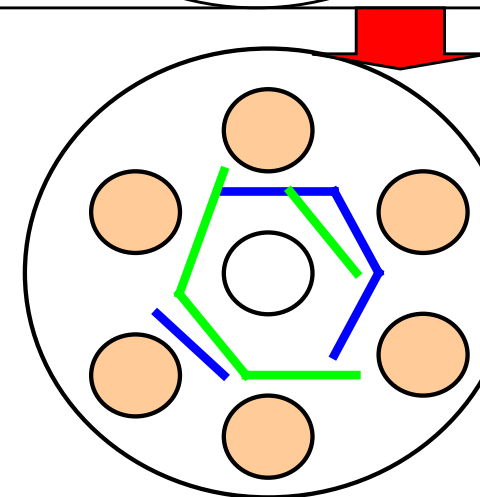
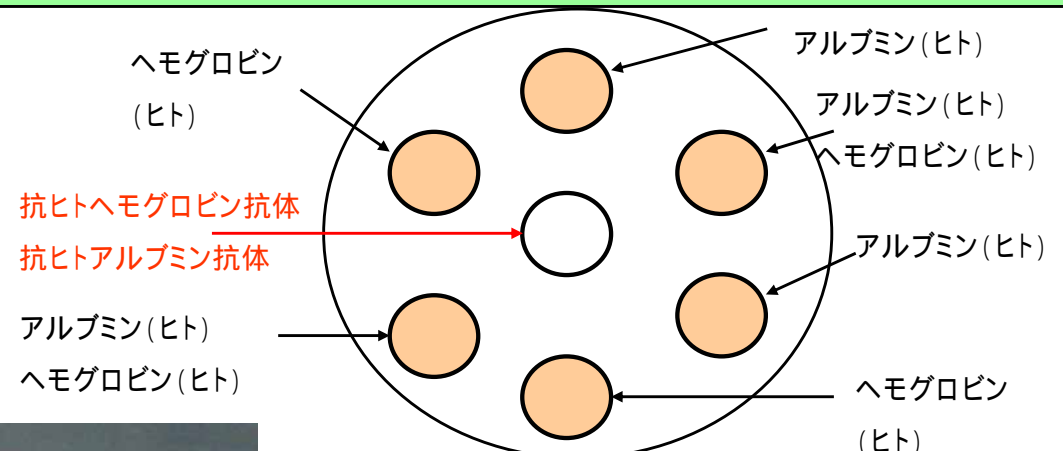
. 赤血球中のヘモグロビン



やっぱりヒトにしか反応しない。
血漿にはヘモグロビンはない。



. 抗体の特異性



線が二重になっている。
すごい！

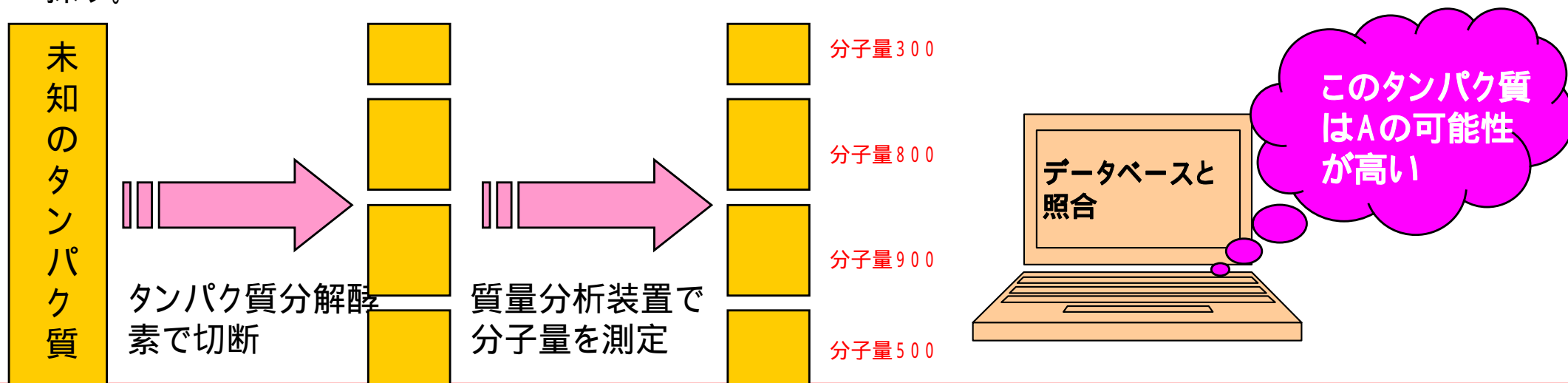
考察

より、おなじヘモグロビンやアルブミンでも生物の種類によって違いがあることがわかった。より、同じ種(ヒト)でもヘモグロビンとアルブミンでは培地への浸透速度に違いがあり、沈降線に差ができることが分かった。また、からは同じ種(ヒト)のアミラーゼなので正六角形になっても良いのにと考えたが、結果が異なることから微妙な差があるのかもしれないと感じた。

質量分析法によるタンパク質の同定

原理

数十個以上のアミノ酸で構成されたタンパク質を特定のアミノ酸やアミノ酸配列のところで切断し、質量分析装置で分子量を測定。コンピュータ上の理論的な分子量リストと照合させて一致するタンパク質を探す。



同定のための前処理

沈降線の切り出し

あらかじめ作っておいたオクタロニーのシャーレから沈降線部分をメスで切り取る。

タンパク質の還元・アルキル化

・還元液(ジチオスレイトールと重炭酸アンモニウム)を加えて30分反応させる。

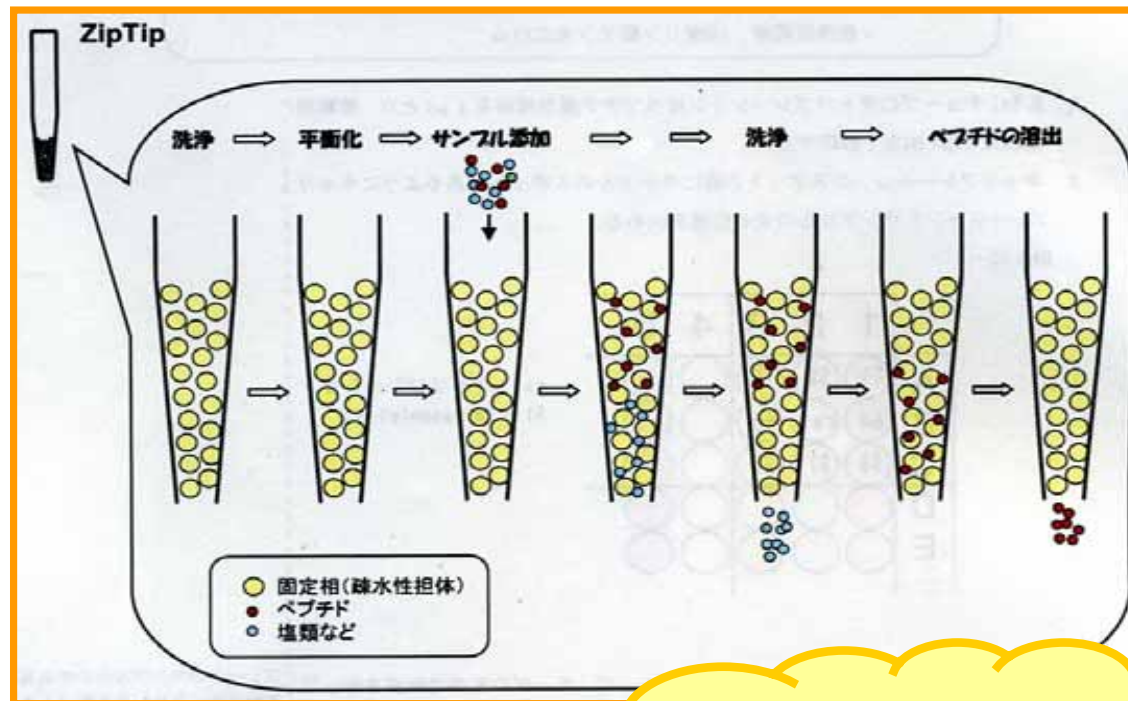
・アルキル化液(ヨードアセトアミドと重炭酸アンモニウム)を加えて遮光しながら30分反応させる。

タンパク質を消化酵素で切断

トリプシン溶液を加えて一晩反応させる。

アルキル化の目的
SH基が酸化するのを防ぐ

ZipTipカラムによるペプチド溶液の精製



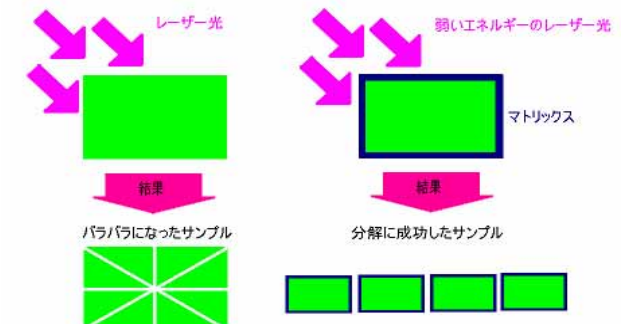
空気が入らないように、
入れたり出したりする
のが大変だ～！

ずーっと押している
から腕が痛い(^_-)



マトリックス支援レーザー脱離イオン化法

タンパク質の分子量の計測はイオン化しないと出来ないが、タンパク質は分子量範囲が広く、1万から数十万の範囲にあり、たやすくはイオン化できない。従来では図1のようにタンパク質サンプルに強いレーザー光を当てていた。しかしこの方法では、物質が分解して気化イオン化し、完全な分子イオンは生じない。そこで、田中耕一さんは分析サンプルにマトリックスという有機化合物や金属を添加すると、比較的弱いエネルギーのレーザー光でも分解が抑えられて、分子の形を留めた分子イオン化が出来ることを見つけた。

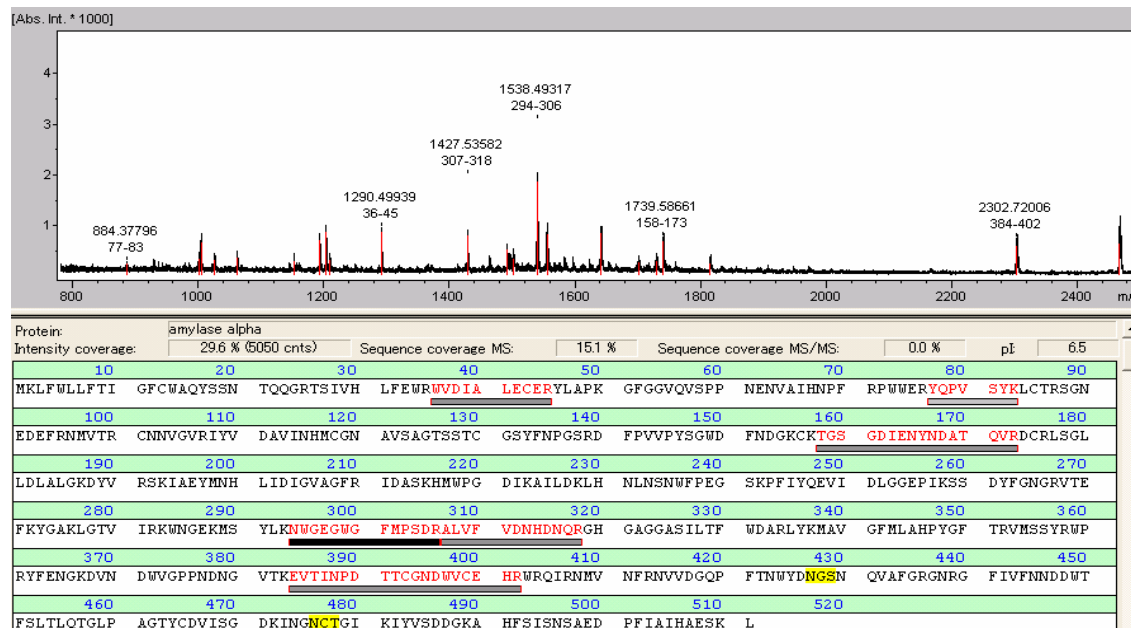
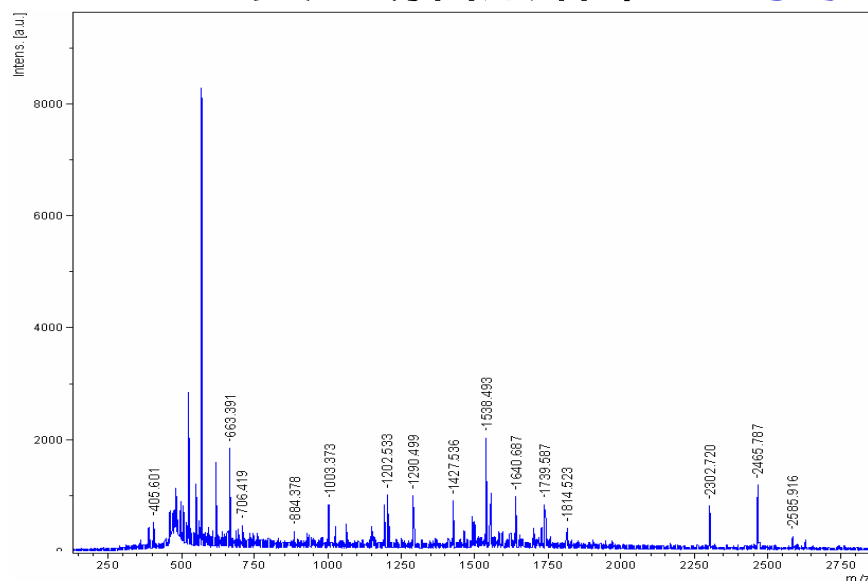


飛行時間型質量分析の原理

その分子イオン化したサンプルをの分子量の求め方は、「同じエネルギーのを加えた場合、分子量の小さいものは速度が速くなり、分子量の大きいものは速度が遅くなる。」という原理を使う。

よってその速さを調べることによって分子量が測定でき、そこからタンパク質の名前を調べることが可能となる。

タンパク質の解析結果・考察

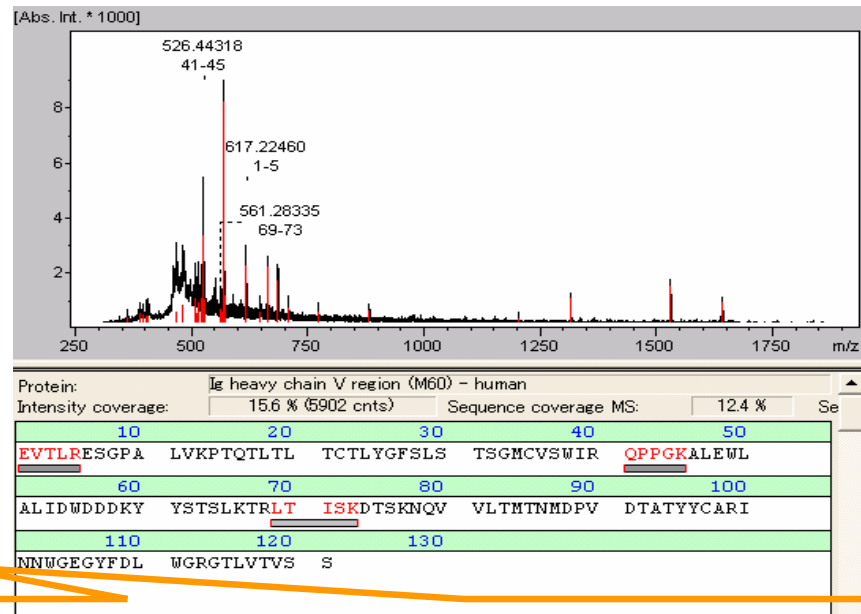
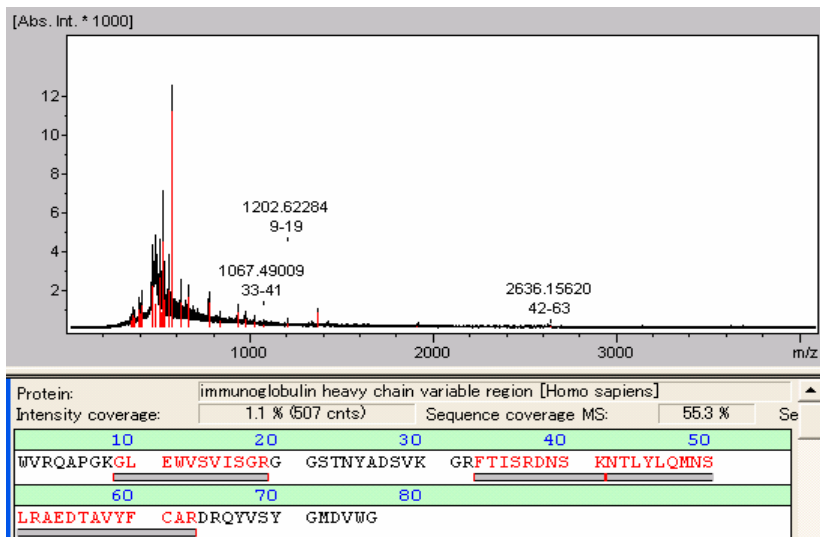


flex Controlを開きレーザー照射。何度か照射してスペクトルを積算保存する。(左上)

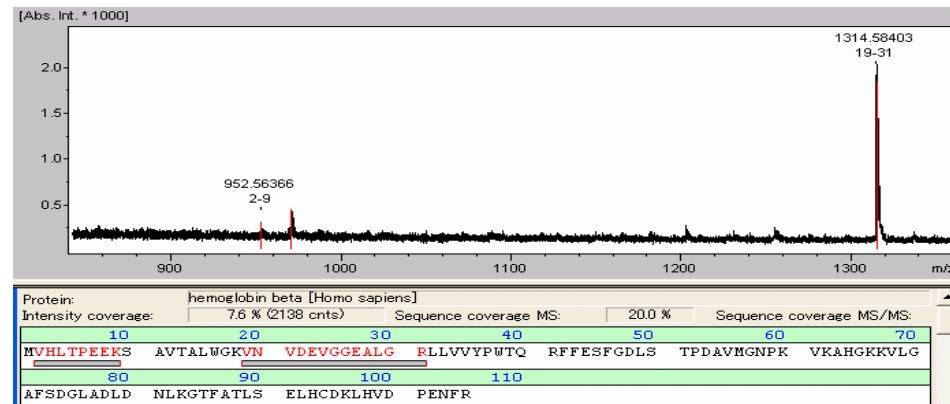
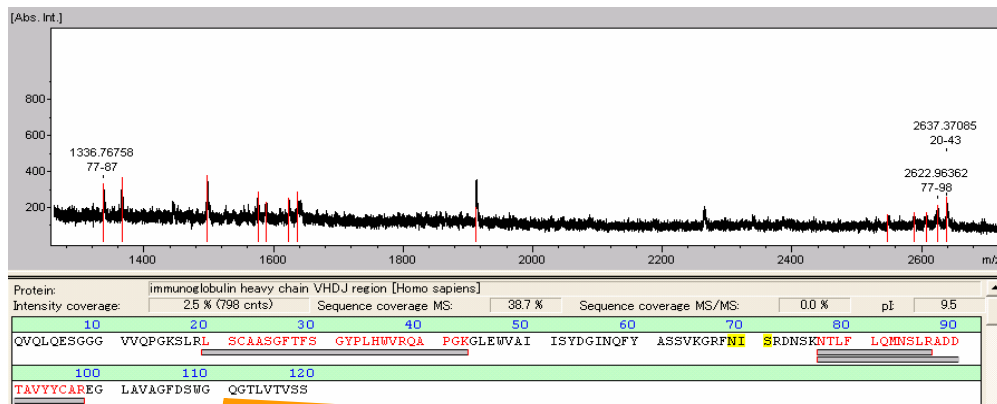
Bio Toolを開き検索するとサンプルと同じペプチドの可能性のあるリストが出てくる。(左下)

ペプチドとマッチしたピークとアミノ酸の配列を表示(右上)

その結果、北山のデータはアミラーゼであることが判明した。

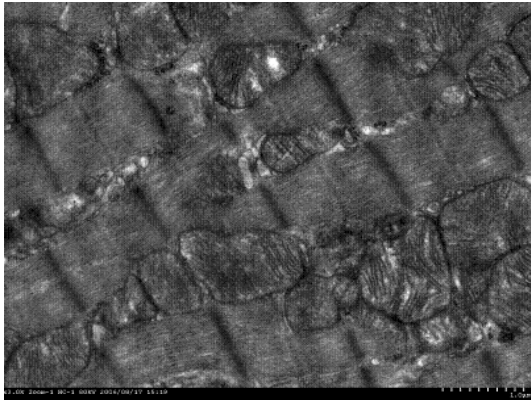


奥村・田中: 2人が確認に用いた沈降線はグロブリンである可能性が高いことが分かった。しかし、北山に比べ、スペクトルのピークがはっきりしておらず、確実とは言い難い。レーザー照射の回数をもう少し増やし、正確なデータを得られるようにすれば良かった。

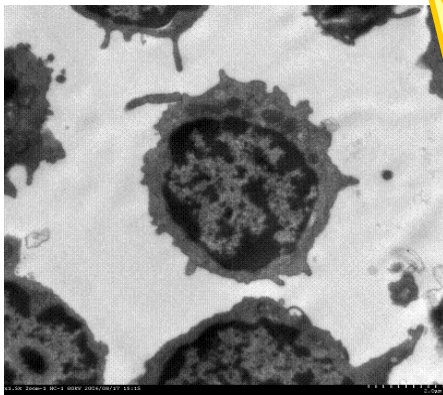


大飼と密山のサンプルは良い結果が得られなかった。その原因は、zip tipによるペプチド溶液の精製の段階において、zip tipの先端に空気が入ってしまったものと考えられる。

共通実験(電顕・レーザー顕観察)

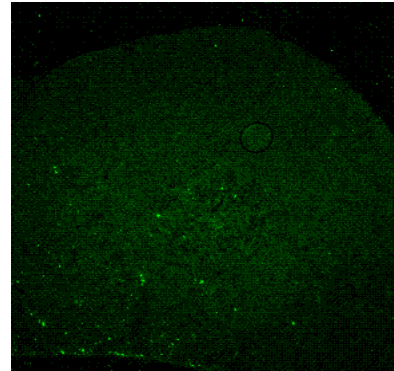


上:心筋の電顕写真

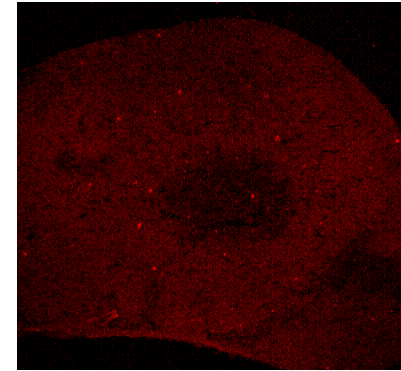


下:脾臓の電顕写真

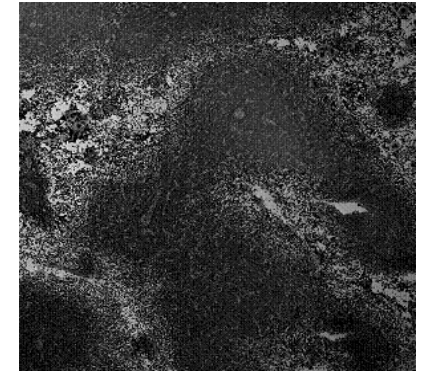
光より波長の短い電子を使用することで微細な構造の観察が可能になった。光学顕微鏡と同様に組織の内部構造を平面的に観察する透過電子顕微鏡と、表面構造を立体的に表示させる走査電子顕微鏡に分類される。



胸腺をCD4で標識

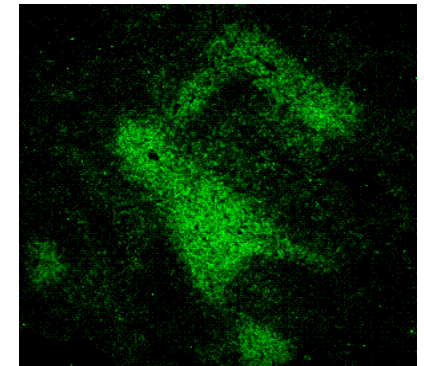


胸腺をCD8で標識



脾臓の組織

CD4で標識すると



謝辞: 今回の実験において、普段体験することの出来ない実験を経験することが出来る機会を提供して下さい、福井大学のスタッフの方々には深く感謝しております。特に、田中先生、佐々先生には実験に対し丁寧な指導をしてくださり、本当にありがとうございました。

