

DIGE法によるプロテオーム解析

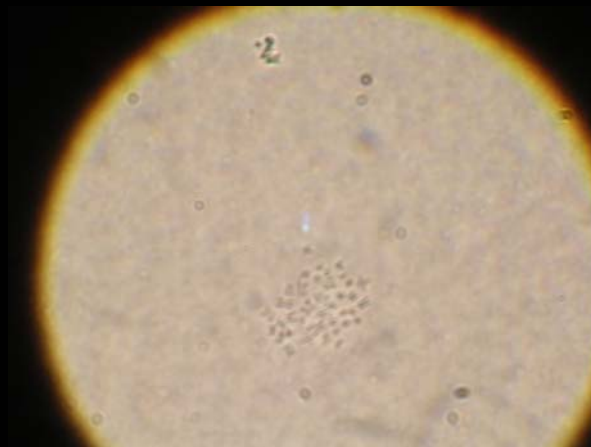
[福井高専]
引率@高山教官
学生@土井みゆき
友田善憲
三上佑介
山本明史



目的



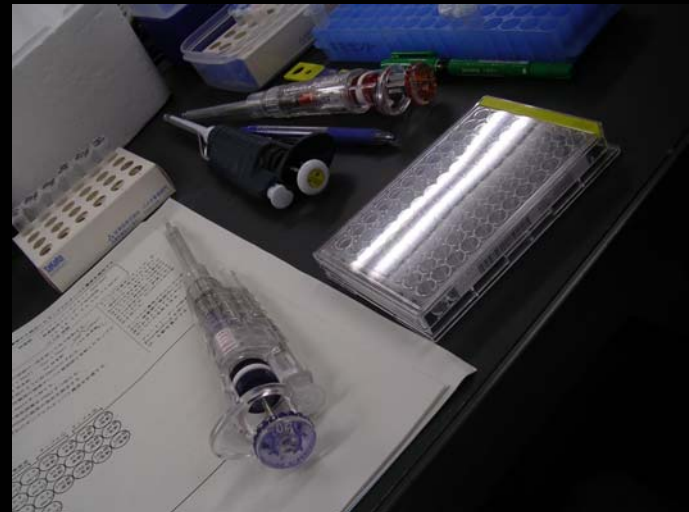
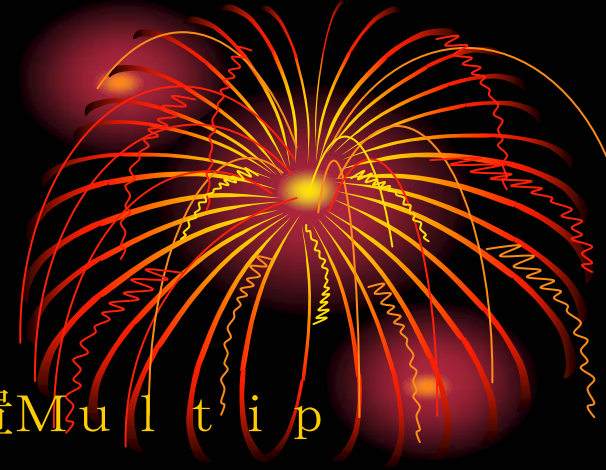
- 蛍光蛋白質を持つおわんクラゲの遺伝子を導入したマウス(GFPマウス)と、一般のマウス(Controlマウス)の腎臓および肝臓の蛋白質組成を二次元電気泳動により解析し、蛋白質の発現量や種類の変化を観察する。



実験器具

- マイクロチューブ
- デイッシュュ
- メス
- ホモジナイザー
- マイクロ冷却遠心機
- 天秤
- 氷
- 96wellプレート
- プレートリーダー
- アイスボックス
- Immobiline DryStrip
(ph4-7、7cm)
- ゲル膨潤トレイ

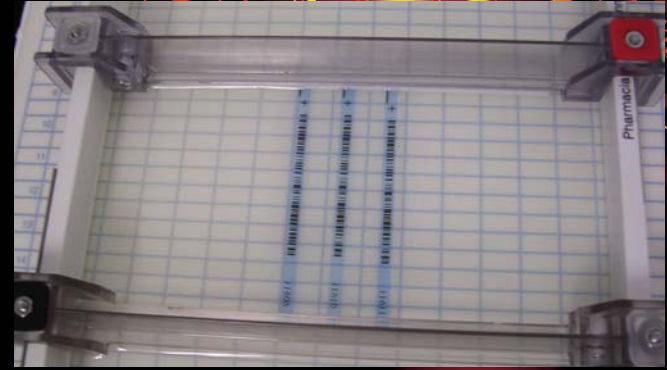
- ピンセット
- 遮光箱
- 電気泳動装置Multi p
h o r
- 電極用濾紙
- シェーカー
- T y p h o o n
- ケイドライ
- 純水



電気泳動のためのゲルについて

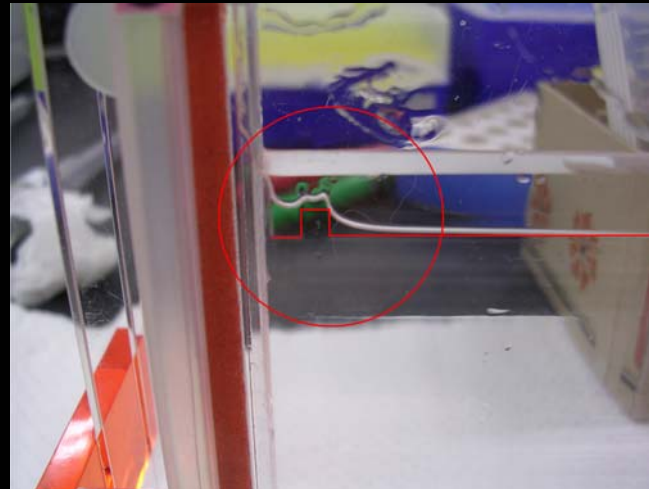
□乾燥ゲルの膨潤(一次元目等電点電気泳動)

→CyDyeでラベリングしたサンプルに濃度の異なる2種類の膨潤液を混合し、膨潤トレイの溝に流し込む。その溝に市販の乾燥ゲル(ImmobilineDryStrip)を下向きにして静かに乗せ、遮光下で10時間以上静置する。



□アクリルアミドゲルの作成(二次元目電気泳動)

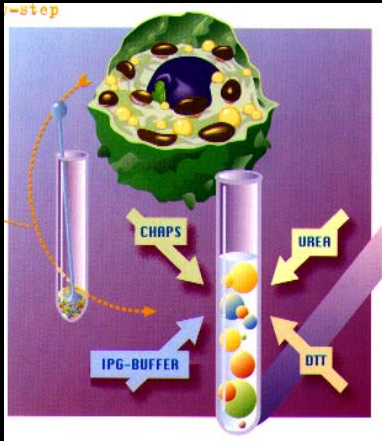
→写真のような型に液状アクリルアミドを流し込み、TEMEDとAPSを用いて重合させて板状のゲルを作る。この間乾燥防止のため、上部にイソプロパノールを重層しておき、完了したら捨て、濾紙で完全に拭きとる。サンプルの泳動開始を平均化するための濃縮ゲル溶液をそのゲルの上に注ぎ、コームで分子量マーカーとの境界を作った上で再度重合させる。



実験フローチャート

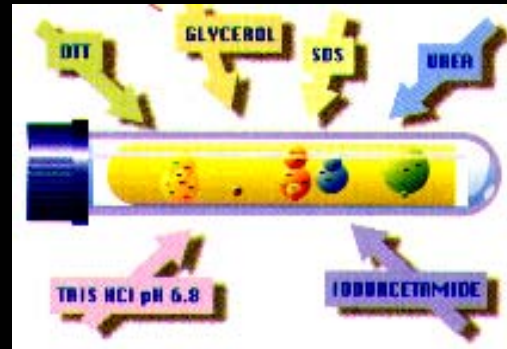
① サンプル調整

細胞抽出液などのサンプルをUreaや非イオン性界面活性剤、還元剤、両性担体などを含む溶液で可溶化する。



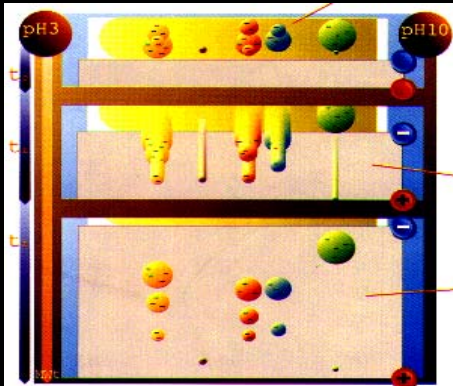
② 一次元目の泳動

一次元目の分離はまずタンパク質のpIの違いによって分離。pIとは個々のタンパク質全体の電荷が無くなり、電場での移動が停止するpHのこと。この性質を利用してタンパク質を分離する方法を等電点電気泳動(Iso Electro Focusing)と言う。一次元目の分離にはpH勾配の固定化されているストリップゲルを使用すると、簡便に再現性のよいデータを得ることができる。



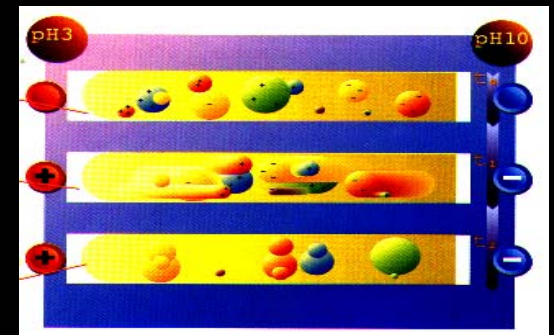
④ 二次元目の分離

二次元目の分離には、タンパク質の見かけの分子量によって分離。



③ 平衡化

IEF終了後、個々のpIに移動したタンパク質をSDS化すると同時に、タンパク質間のジスルフィド結合を還元することで切断し、アルキル化する。

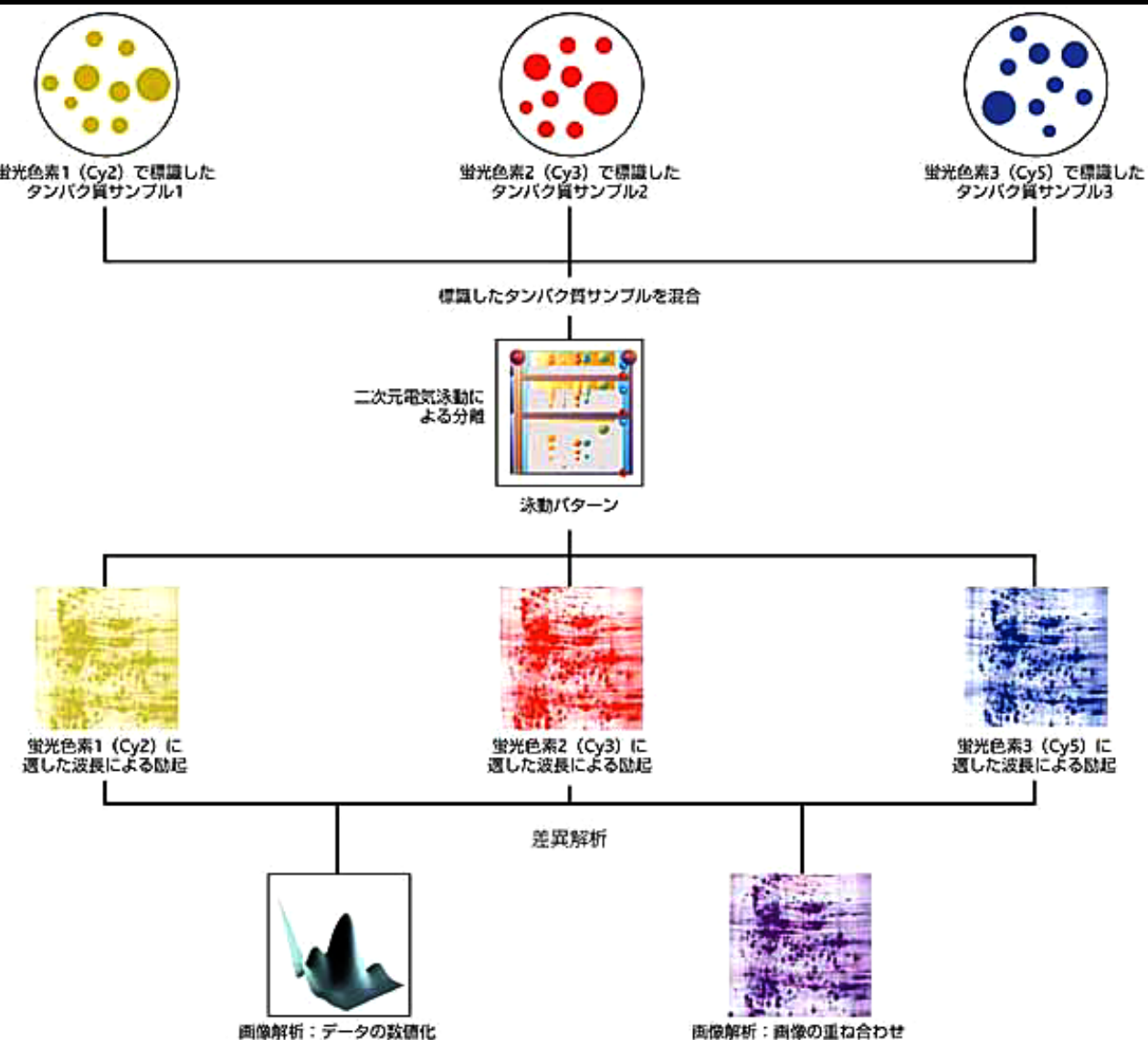


DIGE法による蛋白質のラベリング反応

- 二次元電気泳動の再現性には限界があるので、一度に（一枚のゲル内）で複数のサンプルの結果を見れるようにDIGE法によって蛋白質に蛍光標識をつける。

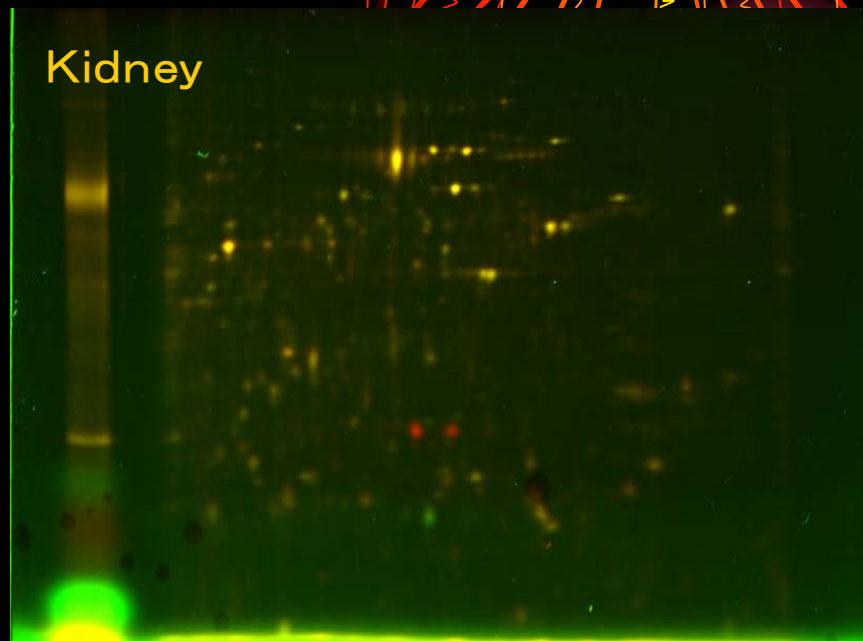
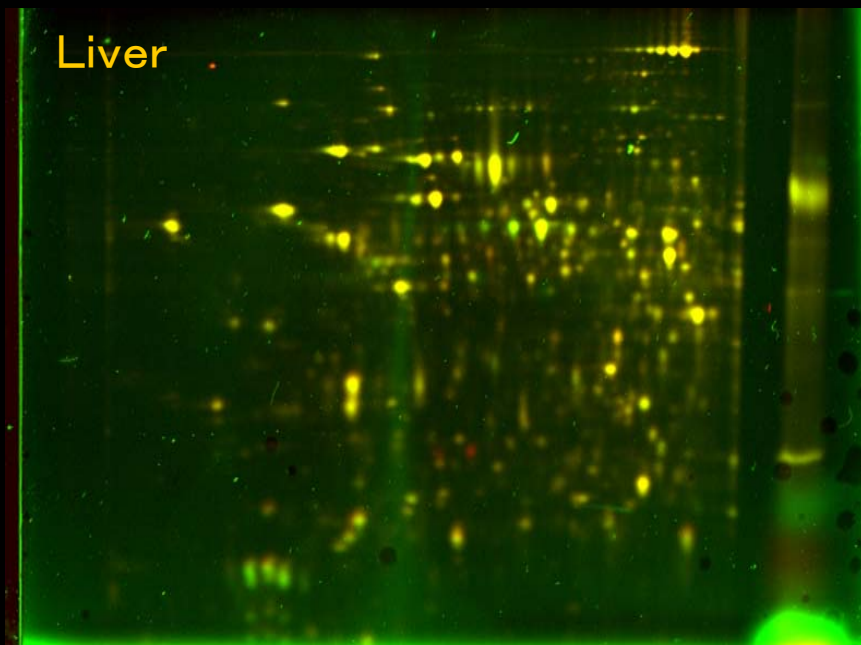
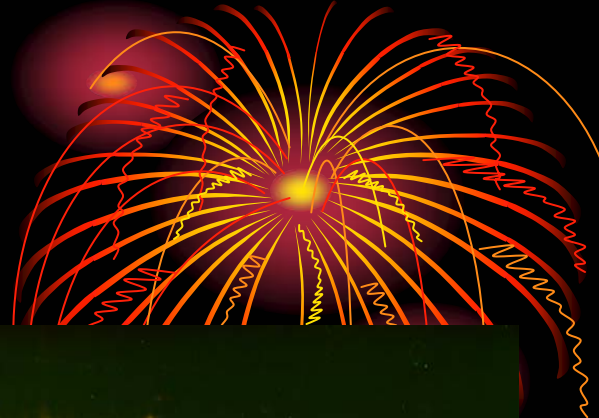


DIGE法の詳細



個々のサンプルごとに発色の異なる蛍光試薬 (Cy3,Cy5等)を結合させる。(実際には蛋白質に含まれるLysineと結合)これによって同一ゲル上(即ち同一条件)でサンプルごとの比較が可能となる。蛋白質の分布は専用の蛍光イメージアナライザー (Typhoon)で測定する。

実験結果



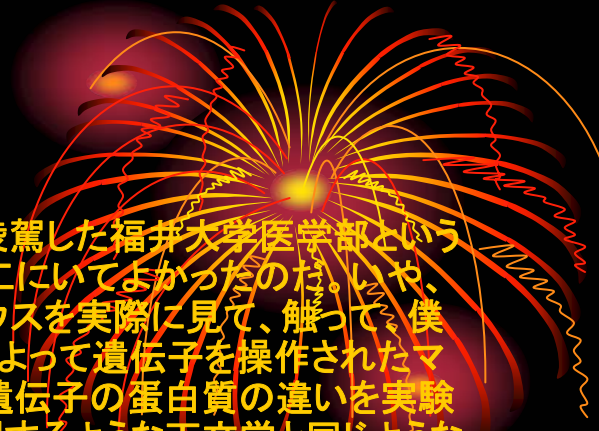
蛋白質のラベリングには赤(GFP)と緑(Control)の蛍光試薬を使った。
ControlとGFP両方に存在する蛋白質は、色が混じるため黄色を呈する。
この実験ではGFPマウスに特有の蛋白質が肝臓、腎臓ともに赤色で現れている。
この蛋白質を分析すれば、蛍光物質の正体を知ることができるだろう。

考察



- ◎この実験では二次元電気泳動を用いて非常に良い精度で蛋白質特定を行うことができた。
- ◎二次元電気泳動によってラベリングした蛋白質特定を行った結果から、GFPマウスと一般のマウスのものでは蛋白質に違いがあることが明らかになった。赤い点、つまりGFPマウスにしか存在しない蛋白質を質量分析器にかけることにより、さらに詳しく追求することができると思われる。
- ◎この技術を応用すれば、病気の原因となる蛋白質の特定なども容易に行うことができる。

感想



- 高レベルな実験理論。高価で高性能な実験器具。僕が想像したものを遥かに凌駕した福井大学医学部という名の未知の世界。僕がこんなところにいてもいいのかと思った。しかし、僕はそこにいてよかったのだ。いや、僕はいるべきだった。今回のSPPは僕の将来に大きな影響を与えた。GFPマウスを実際に見て、触って、僕は何か感動を覚えた。見た目は変わらないのに、その体は光を放ち、人の手によって遺伝子进行操作されたマウスは僕にとってはかつて無いほどの感銘を与えてくれた。そしてGFPマウス遺伝子の蛋白質の違いを実験により発見した。僕は遺伝子やDNAなどは理論的な物だけで、ただ理論を展開するような天文学と同じようなものと考えていた。が、違った。それは理論通りであり、実際に僕は聞いたことも無い薬品を使い実験を通してGFP特有の蛋白質を発見した。味わったことの無い感情が僕を包んだ。僕はこの思いを胸に秘め、これからの学校生活に活かし、そして自分がまだ見ぬ将来へと歩みだしたい。＜友田 善憲＞
- 今回の実験ではGFPの同定をする実験だったが、この実験は人のいろんな病気の治療につながっていく実験だと思う。例えば、癌が原因で、又は癌の原因に成り得る蛋白質の同定を行い、癌の特効薬を作れるようになっていくんだと思う。人は過去に結核やコレラなどをのりこえ、この裏側では科学力の進歩が少なからず関わってきた。この蛋白質を同定する技術や、遺伝子进行操作する技術を応用し、人がさまざまな病気に打ち勝てるようになることを願う。＜山本 明史＞
- 「大学の研究室で実験」最初この企画をこのように聞いたとき、僕は重々しい空気の中黙々と実験をする光景を想像し、無論先生も固い人ばかりだろうと思っていた。なので実際かなり緊張しつつ臨んだのだが、実際ふたを開けてみれば指導していただいた先生方の気さくなこと気さくなこと、行っていることはとても高度なことなのになんだかそれに気安く適応できてしまった。無論気安くとはいってもそこで行われていたことは僕にとっては未知の領域で、僕らはその表面を撫でたに過ぎないのだがそれでも生命の複雑さ、深遠さを感じとる事はできた。遺伝子という一見単純なしかし複雑な仕組みで僕らが形作られていると思うと、自然の神秘に今更ながら驚嘆する。＜三上 佑介＞
- 私たちの学校は工業専門学校なので、普段から実験器具や操作など、実験自体には慣れているつもりだった。しかし、大学の実験設備のスケールの大きさに圧倒され、一つひとつが感動の連続だった。テレビなどで「がんの特効薬ができたらいいですね・・・」といった話を聞くと、(どこかの誰かがいつかは作ってくれるだろう・・・)と思っていたが、こんなに近くで実際にそういった実験をしてみて、とても身近に感じる事ができた。遺伝子の世界だけでなく、他の分野に関しても、新しいモノを造り出すのは「どこかの誰か」ではなく、私たち自身であることに気づき、とてもいい体験ができたと思う。＜土井 みゆき＞