

1. 緒言

本実験では、大腸菌の遺伝子発現機構について、 β ガラクトシダーゼの発現を通じて学んだ。

また、タンパク質の電気泳動を行い、分子量を測定する手法、細菌培養や無菌操作など、生物実験特有の操作についても学んだ。

2. 実験方法

試薬

- 滅菌水
- 大腸菌 (*Escherichia coli*)k-12 株

培養液

- 100mM IPTG (Isopropyl β -D-thiogalactopyranoside)

《LB 培地

- polypeptone 10[g]
- Yeast extract 5.0[g]
- NaCl 10.0[g]

SDS-PAGE 関連試薬

- 分子量マーカー

《SDS-PAGE running buffer》

- SDS(Sodium dodecyl sulfate) 1.0[g]
- Tris 3.0[g]
- Glycine 14.4[g]

《CBB 染色液》

- CBB 5.0[g]
- Methanol 100[mL]
- Acetic Acid 10[mL]

《SDS-PAGE sample buffer》

- SDS 0.40[g]
- 0.5M Tris-HCl 2.0[mL]
- 1M Dithiothreitol(DTT) 2.0[mL]
- Coomassie brilliant blue(CBB) 20.0[mg]
- Glycerol 2.0[g]

《CBB 脱色液》

- Methanol 10[mL]
- Acetic acid 14[mL]
- 30%(w/v)Acrylamide
- Acrylamide 75.0[g]
- N,N'-Methylenebisacrylamide 2.0[g]

《分離ゲル (8%)》

- 30 % (w/v)Acrylamide 2.4[mL]
- 1.5M Tris-HCl 2.25[mL]
- 10%(w/v) SDS 90[μL]
- H₂O 4.17[mL]
- TEMED 7.5[μL]
- APS 75[μL]

《濃縮ゲル (5%)》

- 30 % (w/v)Acrylamide 415[μL]
- 0.5M Tris-HCl 625[μL]
- 10%(w/v) SDS 25[μL]
- H₂O 1.4[mL]
- TEMED 2.5[μL]
- APS 25[μL]

β ガラクトシダーゼ活性測定試薬

- 1M Na₂CO₃
- 0.4%(w/v)ONPG

《Z - Buffer(pH 7.0)》

- 0.2M Na₂HPO₄ 300[mL]
- 0.2M NaH₂PO₄ 200[mL]
- 1M KCl 10[mL]
- 1M MgSO₄ 1.0[mL]
- 1M DTT 1[mL]
- Chloroform 50[mL]
- 10%(w/v)SDS 10[mL]

実験方法

1. SDS-PAGE ゲル調整

1. SDS-PAGE 用ガラス板を洗浄し、二枚の間にスペーサーを挟んでクリップで固定した。
2. ガラス板下部から 6cm のところに印をつけた。
3. 試薬の項に準じて 8% の分離ゲルを 50mL の遠沈管に作成し、ガラス板下部から 6cm のところまでガラス板の間に注いだ。

この時、TEMED,APS の両試薬はゲルが固まるのを防ぐために最後に加えた。

4. ゲルが乾燥しないように滅菌水を 1mL ゲルの上部に注いだ。
5. 分離ゲルが固まった後、滅菌水を取り除いた。
6. 3 同様に試薬の項に準じて 5% の濃縮ゲルを 50mL 遠沈管に作成し、分離ゲルの上部に注いだ。
7. 上部からコームを差込み、一晚静置した。

2. 大腸菌培養

1. 試験管 2 本に LB 培地を 3mL ずつ入れ、それぞれ A,B とラベルをつけた。
2. ガスバーナーで試験管の口・蓋を加熱した後、寒天培地から爪楊枝で大腸菌をとり、植菌した。
3. A の試験管のみ IPTG を 15 μ L 加え、一晚振とう培養した。

3. 大腸菌懸濁液の調整、光学測定

1. 振とう培養の後、1.5mL マイクロチューブに 1mL ずつ分注し、15000rpm で一分間遠心分離した。
2. 培地をマイクロピペットで取り除き、滅菌水 1mL を加えてボルテックスを用いて攪拌し、懸濁させた。
これを大腸菌懸濁液 A,B とした
3. A,B それぞれについて、新しい 1.5mL マイクロチューブ 2 本に大腸菌懸濁液を 50 μ L,100 μ L 分注し、
これをそれぞれ SDS-PAGE 用、光学測定用とした。
4. 光学測定用のサンプルについては滅菌水 900 μ L をさらに加えて、10 倍希釈した。
5. 10 倍希釈した光学測定用サンプルを 200 μ L セルに移し、波長 600nm で光学濃度を測定した。この値を OD_{600} とした。

4. SDS-PAGE

1. 前項で述べた SDS-PAGE 用の大腸菌懸濁液に、SDS-PAGE sample buffer を加え、98 °Cで五分間加熱した。これを SDS-PAGE サンプルとした。
2. SDS-PAGE 用ゲルを泳動槽にたて、SDS-PAGE running buffer を注いだ。また、コームを抜き、ウェルの角度を調整した。
3. 分子量マーカーを 2 μ L,SDS-PAGE サンプルを各 20 μ L ウェルに充填し、上部に負極、下部に正極が来るように電極をつないで電気泳動を行った。

5. β ガラクトシダーゼの活性測定

1. 3-3 で調整した大腸菌懸濁液 A,B をそれぞれ 15mL 遠沈管に 100 μ L ずつ分注した。
2. Z-Buffer 12mL に 10%(w/v)SDS を 120 μ L 加え、よく攪拌して均一になるようにした。
3. 1 の遠沈管それぞれに 2 で作成した Z-buffer を 4.9mL ずつ加え、良く攪拌して均一になるようにした。
これを反応液 A,B とした。
4. 試験管 4 本をそれぞれ A,A',B,B' とし、A,A' には反応液 A,B,B' には反応液 B を 1.3mL ずつ分注した。
5. A',B' には Na_2CO_3 を 500 μ L 加えた。
6. 各試験管をウォーターバスで 28 °Cに保ち、5 分間静置して温度を平衡とした。
7. 試験管に 0.4(w/v)ONPG を 200 μ L 加え、呈色がみられるまでウォーターバスで温度を保ちながら攪拌しながら反応させた。また、ONPG を加えてから呈色がみられるまでの時間を計測した。
8. 呈色がみられた後、すぐに Na_2CO_3 を 500 μ L 加えて反応を停止した。反応がみられない場合は反応開始 5 分後に Na_2CO_3 を 500 μ L 加えた。

9. 1.5mL マイクロチューブに反応後の A,A',B,B' のサンプルを 1.2mL ずつ分注し、13000rpm で 1 分間遠心分離を行った。
10. 各サンプルの上澄を 200 μ L ずつ光学測定ようセルに移し、420nm で吸光度を測定した。

3. 結果

■SDS-PAGE

SDS-PAGE の結果を以下に示す。

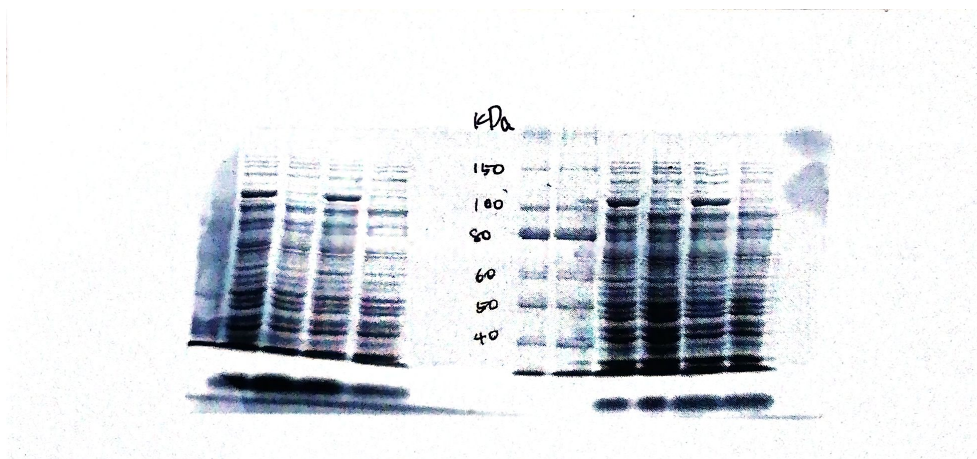


図1 SDS-PAGE

■大腸菌培養液光学濃度測定

IPTG を加えた大腸菌培養液 A, 加えなかった大腸菌培養液 B について、光学濃度 (OD_{600}) を測定した。結果を以下の表に示す。

| サンプル | OD_{600} |
|------|------------|
| A | 0.623 |
| B | 0.681 |

■ β ガラクトシダーゼ活性

β ガラクトシダーゼ活性の測定に用いたサンプル A,A',B,B' について、呈色までに要した時間、呈色した後の吸光度について以下の表に示す。

| サンプル | 時間 [sec] | 吸光度 OD_{420} |
|------|----------|----------------|
| A | 15 | 0.107 |
| A' | 300 | 0 |
| B | 122 | 0.064 |
| B' | 300 | 0 |

呈色がみられなかった物、吸光度が負の値になった物は時間を 300[sec], 吸光度を 0 とした。

4. 課題

■課題 1

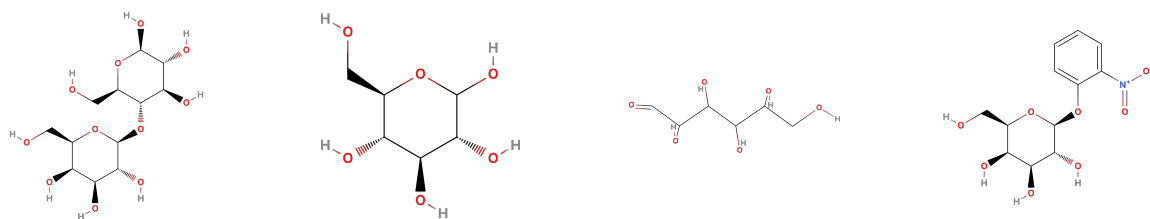
大腸菌のラクトースオペロンでは、今回の実験で用いた β ガラクトシダーゼをコードする遺伝子 lacZ などが含まれている。通常は、これらの遺伝子の手前にあるプロモーター領域にリプレッサーと呼ばれる阻害因子が結合している。このリプレッサーにより、RNA ポリメラーゼによる転写が阻害されるため、通常は lacZ などの遺伝子は発現しない。また、ラクトースはリプレッサーに結合するため、lacZ はラクトースが過剰なときに発現する。これは、ラクトースが過剰な時にその代謝を促すため、と考える。これが負の調節機構である。今回用いた IPTG はリプレッサーと親和性が高いため、これを用いてリプレッサーを取り除くことができる。よって RNA ポリメラーゼが結合可能となり、lacZ によってコードされる β ガラクトシダーゼが合成される。これが IPTG によるタンパク質発現誘導である。

一方、トリプトファンオペロンは通常阻害因子を持たないが、トリプトファンとリプレッサーが結合すると遺伝子発現が阻害される。これはトリプトファンが過剰な時にその産生を抑えるため、と考える。これが正の調節機構である。

■課題 2

β ガラクトシダーゼは本来、ラクトース (図 1) をグルコース (図 2) とガラクトース (図 3) に分解する反応を触媒する。これは、分子中のグリコシド結合を加水分解して切断する反応である。

ONPG (図 4) はガラクトースと O-ニトロフェノールがグリコシド結合した物質であり、酵素により分解すると黄色の o-ニトロフェノールが産生する。この呈色により β ガラクトシダーゼの活性を測定する。(左からラクトース、グルコース、ガラクトース、ONPG)



■課題 3

泳動により見られたバンドのうち、求めるタンパク質の周辺のゲルを取り、ゲルの成分とタンパク質を分離する。泳動によりタンパク質は分離するため、あるバンドには同じ種類のタンパク質が集まっている。この部分のみを取り出すことで他のタンパク質の汚染の少ない、高純度のタンパク質を得ることが可能である。

■課題 4

SDS-PAGE は、分離用ゲルにポリアクリルアミド (PAGE), タンパク質の変性に SDS を用いる泳動法である。

タンパク質は等電点以外の pH では正または負の電荷を持っており、この状態で電圧をかけることでタンパク質を電極に引き寄せることができる。この性質を利用したものが電気泳動である。

電気泳動では、網目状のゲル内での移動距離が分子量と相関を持つことを利用してタンパク質を分離する。これは、分子量が大きいタンパク質はゲルの網目に絡まって移動距離が短くなり、逆に分子量が小さいタンパク質はゲルをすり抜けて移動距離が長くなるという関係であり、タンパク質分子が直鎖状である時のみ成立する。しかしタンパク質は、ジスルフィド結合や静電的相互作用などにより折り畳まれた高次構造を持っているため、泳動に適さない。

よって、負電荷を持つ界面活性剤である SDS をタンパク質表面の正電荷と結合させることで静電的相互作用を阻害し、タンパク質を直鎖状にして泳動を行うことでタンパク質の分子量を得ることができる。これが SDS-PAGE である。

SDS-PAGE では SDS によるタンパク質の変性を伴うが、変性を伴わない泳動法には以下のようなものがある。

- Native-PAGE 法

ポリアクリルアミドゲルを用い、SDS による変性を行わずに泳動する方法である。タンパク質の立体構造が保たれるため、正確な分子量の測定には適さないが、目的のタンパク質のみを染色、標識することで分離することが可能である。

- 等電点分離法

pH 勾配のあるゲル中で電気泳動を行う方法である。先述の通り、タンパク質は等電点では電荷を持たず、電場の影響を受けずに静止する。等電点はタンパク質により異なるため、静止した位置によりタンパク質を測定することができる。

■課題 5

タンパク質の泳動により作成した検量線は以下の通りである。

グラフは縦軸を対数軸とし、検量線は関数形を以下のようににおいて最小二乗法による累乗近似を行った。

$$y = 10^{Ax+B}$$

近似により、

$$A = -0.02343557B = 2.30343239$$

と求めることができた。

この検量線より、βガラクトシダーゼの分子量を算出すると、108[kDa] となった。βガラクトシダーゼの分子量は 116[kDa] であり、下方誤差がみられた。これは SDS による変性が足りず、ペプチド鎖が直鎖状になりきらなかったためと考える。

■課題 6

4. 結果より、ONPG と βガラクトシダーゼの反応による吸光度変化から βガラクトシダーゼの活性を算出した。

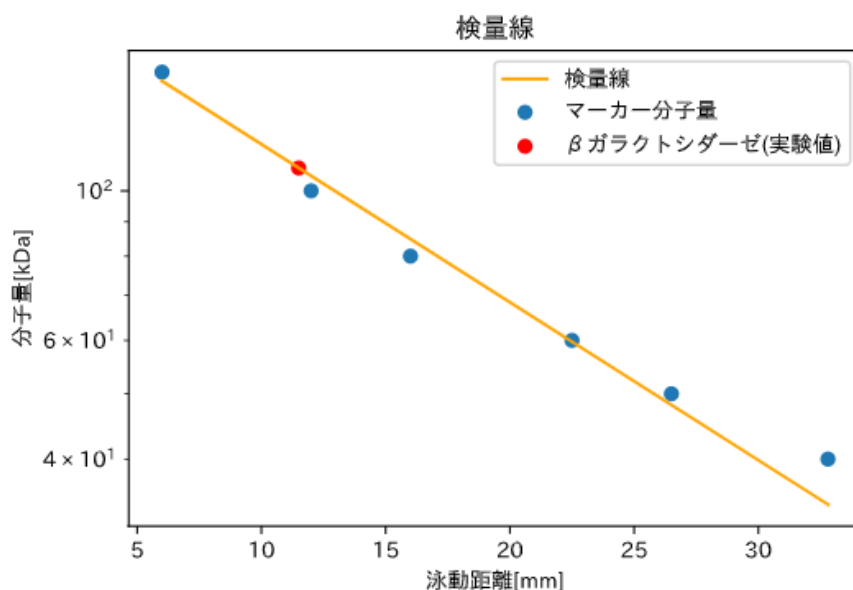


図2 検量線

o-ニトロフェノールの生合成量 [nmol] は以下の Lambert-Beer 則にて算出した。

$$A = \epsilon cl$$

(ϵ =モル吸光係数, c =モル濃度, l =光路長, A =吸光度) 今回の条件ではモル吸光係数は $0.0045[\text{mL nmol}^{-1}\text{cm}^{-1}]$, 光路長は $1[\text{cm}]$ とした。

次に、o-ニトロフェノールの生合成量から β ガラクトシダーゼの活性を算出する式は以下の通りである。

$$\beta\text{-ガラクトシダーゼ活性} = \frac{\text{o-ニトロフェノールの生合成量}}{\text{反応時間} \times \text{反応に使用した菌体量}}$$

反応に使用した菌体量は、光学濃度 (OD_{600}) より以下の式で求められる。

$$\text{反応に使用した菌体量} = \text{反応に使用した培養液量} \times \text{OD}_{600}$$

ここで、ONPG との反応に用いた培養液は $100[\mu\text{L}]$ より、サンプル A,B それぞれの β ガラクトシダーゼ活性は以下の表の通りとなる。

| サンプル | 活性 $[\text{nmol mL}^{-1}\text{min}^{-1}]$ |
|------|---|
| A | 1526 |
| B | 103 |

IPTG を入れた A のサンプルの方が β ガラクトシダーゼ活性が高く、リプレッサーの排除により負の調節機構が働かなくなり、 β -ガラクトシダーゼがより多く産生されたと考える。一方、B のサンプルもわずかに β -ガラクトシダーゼが産生されていることがわかる。これは、何らかの理由で調節機構が働いていなかった大腸菌が少量混入、増殖していたためと考える。

5. 結言

今回の実験を通じて、遺伝子発現の調節機構について理解が深まった。また、無菌操作等も実際に行うことができたため、本実験の目的は達成されたと言える。

6. 参考文献

- β -D-ガラクトシダーゼの開発と利用, 齋藤忠夫 他著, 乳業技術 vol67, 2017
- ポリアクリルアミド電気泳動(SDS-PAGE)の原理と方法 | MBL ライフサイエンス, <https://ruo.mbl.co.jp/bio/sup-port/method/sds-page.html>