

1 目的

膨大な種類の蛋白質を含んでいる生体試料より、特定の蛋白質のみを検出する手段であるウェスタンブロッティングという方法の、一連の操作の原理とその有用性について理解する。本実験では特に、検出した蛋白質を定量し、動物の組織ごとの発現の違い等について議論する。

2 原理

2.1 SDS-PAGE

生体内には様々な種類のタンパク質が含まれている。このタンパク質は mRNA 配列が指定する 20 種類のアミノ酸からできており、アミノ酸によって極性が異なるためタンパク質ごとに違う電荷を持つ。また、タンパク質は高次の立体構造を持つ。以上の理由より、タンパク質をそのままの状態で電気泳動するのは電荷的、立体的に難しい。

ポリアクリルアミド電気泳動(SDS-PAGE)は、SDS(ドデシル硫酸ナトリウム)とポリアクリルアミドゲルを組み合わせた電気泳動法である。SDS はタンパク質の主ペプチド鎖部分に一定の割合で結合する性質がある、タンパク質変性作用の強い界面活性剤だ。これによってタンパク質の立体構造に寄与しているジスルフィド結合(-S-S-)や電荷同士の結合が切断され、タンパク質はペプチド鎖長に応じた SDS 由来の負電荷を持ち、一様に直鎖状に近い構造に変性される。

SDS を作用させ変性を行ったタンパク質をポリアクリルアミドゲル中で電気泳動を行うと、ペプチド鎖長に応じてつまり分子量の違いによって分離することができる。低分子量ほどゲルの網目に捉えられることなく移動するので移動度は長くなる。

2.2 ウェスタンブロッティング

ウェスタンブロッティングは、電気泳動のすぐれた分離能と抗原抗体反応の高い特異性を組み合わせて、タンパク質混合物から特定のタンパク質を検出する方法である。SDS-PAGE によって分子量の違いで分離されたタンパク質はゲル中に含まれる。分離された様々なタンパク質の中から目的のタンパク質を検出するために抗原抗体反応を利用するが、ゲルのままでは分離したタンパク質がゲル中へ拡散したり、ゲルが薄く取り扱いが難しかったりといった問題が生じてしまう。そこでタンパク質をゲルから電氣的にメンブレンへ移動、固定しブロット(ブロットメンブレン)を作製し、抗原抗体反応を起こす方法が

主にとられる。メンブレン(膜)にはタンパク質が結合しやすい疎水性の高いニトロセルロースや PVDF (PolyVinylidene DiFluoride)が用いられる。

メンブレンに移動・固定したタンパク質は抗原となり、この抗原に特異的に結合する抗体を添加することで結合の有無から目的タンパク質の検出が可能である。抗体を検出するためには抗体を標識する必要がある、目的タンパク質だけに特異的に結合する抗体は貴重かつ高価であるため非効率だ。そこで目的タンパク質の検出には目的タンパク質に特異的な一次抗体、その抗体を生産した動物由来の抗原を認識し結合する抗体を標識した標識二次抗体が用いられる。標識には酵素を用いる系、蛍光を用いる系などがある。酵素を用いる系では、HRP(Horse-Radish Peroxidase)や AP(Alkaline Phosphatase)などで標識した二次抗体を一次抗体に反応させて、酵素活性による発色や化学発光により検出する。化学発光による検出には、X線フィルムへの露光検出または化学発光を検出可能なスキャナーを必要とするが、発色法にくらべ10~50倍以上も感度が高く、微量タンパク質の検出が容易というメリットがある。蛍光法は、Cy3 や Cy5 で標識した二次抗体を蛍光検出するため定量性に優れるというメリットがある。

今回用いた HRP は酸素原子同士の結合を切断し、生じたラジカル(電子)がルミノールなどの発光物質を攻撃することで発光される。

3 実験操作

3.1 実験器具

- ・ピペットマン
- ・転写装置
- ・検出装置 LAS-4000
- ・ブロッキング用ろ紙
- ・SNAP i.d. 吸引式免疫反応システム(SNAP i.d. 装置本体、プロットホルダー、吸引ポンプ)
- ・電気泳動装置
- ・抗体反応、洗浄用装置
- ・転写膜

3.2 試薬

- ・SDS-PAGE サンプル処理液
30% (v/v) glycerol, 50 mM Tris-HCl, 10% (w/v) SDS, 250 mM DTT, 10 mM EDTA, 0.1% (w/v) CBB-R, pH 6.8
- ・SDS-PAGE 緩衝液(SPB)
25 mM Tris-HCl, 192 mM glycine, 0.1% (w/v) SDS, pH7.4

- ・ ウェスタンブロッティング緩衝液(WBB)
20% (v/v) CH₃OH, 100 mM Tris-HCl, 192 mM glycine, 0.1% (w/v) SDS
- ・ TBS 緩衝液(TBS)
50 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, pH 7.4
- ・ T-TBS 緩衝液(T-TBS)
50 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 0.05% (v/v) Tween 20, pH 7.4
- ・ 抗体溶液
- ・ 牛血清アルブミン
- ・ 検出試薬

3.3 実験手順

3.3.1 試料の調整

- ①試料はすでに調整されていたものを用いた。

(生体より取り出した組織片に対し、SDS-PAGE サンプル処理液が最終的に 5 倍に希釈されるように加え、ホモジナイザーを用いて組織をすりつぶした後、95℃において 5 分間熱処理したものを用いた。)

3.3.2 SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動

- ②①の試料を、すでに用意されていたポリアクリルアミドゲルに順次ロードした。
- ③70 mA の定電流で電気泳動を行った。電圧は最初は 145 V であったが、終了時には 170 V にまで上昇していた。
- ④電気泳動終了後、ゲルを慎重に破れないようにしながらガラス板からはがし、ウェスタンブロッティング緩衝液(WBB)に浸した。

3.3.3 ウェスタンブロッティング

- ⑤予めゲルの大きさに合わせてきつておいた転写膜とろ紙を、ゲルとの間に気泡が入らないように注意しながら、転写装置に下から順に、ろ紙 2 枚・転写膜・ゲル・ろ紙 2 枚を重ねた。
- ⑥定電流(2 mA/cm²)により、転写を 1 時間行った。
- ⑦転写終了後、転写膜を T-TBS 緩衝液に約 5 分間浸した。

3.3.4 抗体反応

- ⑧転写膜をブロットホルダーにセットし、SNAP i.d. 装置全体にセットした。
- ⑨BSA/T-TBS 溶液を 4 mL ずつ計 3 回ウェルに流し込み、ブロッキング反応を行った。

- ⑩⑨により希釈した一次抗体をウェルに流し込み、10 分間室温で反応させた。
- ⑪T-TBS 溶液を 4 mL ずつウェルに流し込み、洗浄した。
- ⑫⑪により希釈した二次抗体をウェルに流し込み、10 分間室温で反応させた。
- ⑬⑪を再び行った。
- ⑭SNAP i.d. 装置本体よりブロットホルダーを取り出し、さらにブロットホルダーより転写膜を取り出した。

3.3.5 シグナルの検出

- ⑮転写膜に発光基質を加え、室温で 5 分間反応させた。
- ⑯反応液をよくふき取り、転写膜を検出器 LAS-4000 にセットし検出を行った。

4 実験結果

転写膜を転写し得られた結果(写真)は、レポート末尾に添付した。

また、観測できたバンドの有無(観測できなかった場合は×)、バンドの濃さ(薄く見える場合は△、濃く見える場合は◎、濃くも薄くもなく見える場合は○)を、以下の表にまとめた。

表 1. A 班の実験結果の観察

マーカー /bp	視床下部		視交叉上核					肝臓	
	10	22	11	23	8	20	20L	10	22
130	×	×	×	×	×	×	×	○	△
95	×	×	△	○	○	○	○	○	△
70	×	×	△	○	○	○	○	△	△
62	○	○	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎
51	○	○	○	○	○	○	○	○	○
42	○	○	○	○	○	○	○	○	○

表 2. B 班の実験結果の観察

マーカー /bp	視床下部		視交叉上核					肝臓	
	10	22	11	23	8	20	20L	10	22
130	×	×	×	×	×	×	×	△	△
95	×	×	○	○	○	○	○	△	△
70	○	○	○	○	○	○	△	○	△
62	○	○	○	○	◎	○	○	△	×
51	○	○	○	○	◎	○	○	○	×
42	○	○	◎	◎	◎	○	○	○	×

B 班の肝臓の下の方はあまり発現が見られなかった。試薬が万遍なくかけられていなかったことが一因として考えられる。

5 考察

視床下部について、大きな蛋白質が少ないことは結果を見て明らかである。写真をみると、10 時のものよりも 22 時のものの方が、発現は少ないことが確認できた。夜になると目の働きが小さくなるためであると考えた。

視交叉上核について、A 班では 62bp 近くで強く発現しているのに対して、B 班では 51bp 付近で強く発現していた。真夜中に近い時間帯のものは全体的に発現が弱く、朝の 8 時のものが一番発現を観察できた。20 時で、暗い中でもものと、15 分ほど光をあてたものを比較すると、光をあてたものの方が強く発現しているのが確認できた。これは、朝は脳の働きが活発であるが、夜はそうではないことの表れであると考えた。20 時に光をあてたものの発現が強かったのは、光を当てたことによって脳が夜ではないと勘違いしてしまったためである。

肝臓について、10 時のものより 22 時のものの方が全体的に発現が弱かった。これは、夜になると消化活動がなくなるためであると考えた。B 班の方では白くなってしまい確認できなかったが、どちらの時間でも 62bp 以下の部分で発現が見られた。

6 課題

6.1 SDS-PAGE の原理

これについては原理 2.1 を参照していただきたい。

6.2 一般的な抗体の作成方法

そもそも抗体とは、感染性病原体などの異物による動物の体内への侵入に応答し、免疫系の一部である B 細胞によって産生されるものである。抗体は、抗体の産生を引き起こした抗原に結合し、抗原が破壊されるようにフラグを付け、感染症と闘う手助けをする。

例えば、ウサギなどの動物に抗原を投与すると、外部から侵入した抗原を異物だと認識し、血中に含まれる白血球がマクロファージに分化し、貪食作用によって異物を除去しようとする自然免疫が働く。血液中に抗体を大量に産生させ、繰り返し免疫後、数ヶ月してから血液(血漿、血清)を回収し、そこから抗体が精製することができる。このとき得られる抗体は、免疫原に反応する非常に多くの種類の抗体をもつため、ポリクローナル抗体とよばれる。

しかし、この方法で得られる抗体は侵襲性もコストも高く、不安定である。抗体を産生している B 細胞をひとつだけ取り出し、半永久的に培養・増殖させることができれば、抗体を安定的にとることが可能である。この抗体をモノクローナルとよぶ。抗体を産生している B 細胞と不死化したがん細胞(ミエローマ)を人工的に融合させ、特定の抗体遺伝子を維持しつつ、半永久的に製造できる融合細胞を作製するのだ。

6.3 ウェスタンブロッティングで複数のバンドが見られた理由

電気泳動をみると、目的のタンパク質のすぐ下にも発現が見られる。これに対して、原因は二つあると考えた。

一つ目は、分子量の小さい蛋白質も大きいものも生じていたことである。蛋白質にはさまざまな大きさのものがあるからだ。

もう一つは、蛋白質の性質にある。蛋白質は、分子の大きさに関わらずガラスなどの高分子に吸着することがある。これにより、全体的に満遍なく着色すなわち発現をしているものだと考えられる。

6 引用・参考文献

- ・『Essential 細胞生物学』 訳・中村桂子他 南江堂出版
- ・ウェスタン・ブロッティング(WB)の原理と方法
URL : <http://ruo.mbl.co.jp/bio/support/method/westernblotting.html>
- ・抗体の作成方法 — MBL ライフサイエンス
URL : <http://ruo.mbl.co.jp/bio/support/method/antibody-production.html>