

科学研究費補助金研究成果報告書

平成24年 5月31日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20550072

研究課題名(和文) 低濃度ゲルを用いる高性能二次元電気泳動法の開発と応用

研究課題名(英文) Development of High-Performance Two-Dimensional Electrophoresis Using Low-Concentration Gel and Its Application

研究代表者

小竹 玉緒 (ODAKE TAMAO)

東京大学・大学院工学系研究科・研究員

研究者番号：10301128

研究成果の概要(和文)：研究代表者らは分離能の高いタンパク質分離法である二次元電気泳動法(2-DE)の一次元目の等電点電気泳動ゲルとして、糸を支持体とする糸ゲルを開発してきた。糸ゲルにより、従来問題であった操作性が改善され、ゲルを低濃度化でき、高分子量タンパク質の分離を可能にした。本研究では、操作性と再現性の向上のため、低濃度糸ゲルの支持体、重合法、pH 勾配固定化を検討した。開発した低濃度糸ゲルを用いる 2-DE は、プロテオーム解析に有用であることがわかった。

研究成果の概要(英文)：The researchers have developed a new isoelectric focusing (IEF) gel supported by a multifilament as a first-dimensional IEF gel of two-dimensional electrophoresis (2-DE), which can separate proteins with high-resolution. The multifilament-supporting (MFS) gel could overcome difficulty in handling the IEF gel, prepare low-concentration gel to separate high-molecular-weight proteins. In this study, to improve operability and reproducibility, support of the low-concentration gel, method of polymerization, and introduction of immobilized pH gradient were investigated. The 2-DE system using the low-concentration MFS gel was proved to be useful for proteome analysis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・分析化学

キーワード：分離分析、電気泳動

1. 研究開始当初の背景

二次元電気泳動法(two dimensional electrophoresis, 2-DE)は、一次元目に細長いゲルを用いてタンパク質をその等電点の違いで分離し、泳動後の一次元目ゲルを二次元目の平板ゲルに接着した後、一次元目とは垂直の電場で、タンパク質をその大きさで

分離する分離分析法である。タンパク質をその等電点と大きさ(分子量)の2つのパラメータで分離できるため、分離能に優れ、プロテオミクス研究において非常に期待されている。しかしながら、従来の2-DEは実験操作が難しく、泳動時間が長く分析に2,3日を要する等の問題があり、分離能に優れている

にもかかわらず実際にはその利用は限られている。そこで研究代表者らは操作を簡便にし、泳動時間を短縮させるため、一次元目ゲルとして、糸を支持体とするゲル（糸ゲル）をこれまで開発してきた。（J. Li, A. Ogasawara, T. Odake, T. Umemura, and K. Tsunoda, A New Isoelectric Focusing System for Fast Two-Dimensional Gel Electrophoresis Using a Low-Concentration Polyacrylamide Gel Supported by a Loose Multifilament String, *Anal. Sci.* **20**, 1673-1679, (2004).)

糸ゲルでは、糸が支持体となっているので、糸の部分をつまむことによりゲルを容易に操作でき、従来 4%（文献では 3.3%が下限）であるゲルの濃度を 2.5%まで低下させることができるという利点がある。ゲル濃度はゲルの細孔径と反比例するので、ゲル濃度が低下するほどゲルの細孔径は大きくなり、タンパク質が移動しやすくなる。したがって、泳動時間を短縮できるばかりか、これまで通常の 2-DE では難しかった膜タンパク質などの高分子量タンパク質の分析が可能となる。

2. 研究の目的

これまで研究代表者らは糸の材質、太さ、本数などの糸ゲル作製条件を検討してきた。実際に高分子量タンパク質である 669 kDa のチログロブリンを一次元目の泳動 30 分、二次元目の泳動 25 分、合計泳動時間 1 時間以内で分離できることを示した。

しかしながら、糸ゲルを用いて従来の 2-DE の問題をある程度解決したものの、2-DE の普及にはまだ及ばない。その理由は、

- ・糸ゲル作製上の問題、すなわち、同一品質の糸ゲルの作製が難しい
- ・一次元目の等電点電気泳動 (isoelectric focusing, IEF) の際に用いる両性担体が pH 勾配形成の役割を担っているが、電気浸透流等の影響により担体自身が泳動し pH 勾配が変動する
- ・独自に開発してきたシステムであるため、実施例が少ない等が挙げられる。

そこで本研究では、以下の各項目について検討した。

- (1) 同一品質の糸ゲルを得るための糸ゲルの最適設計と糸ゲル作製条件の最適化
- (2) 固定化 pH 勾配 (immobilized pH gradient, IPG) 法などの、pH 勾配の安定化の検討
- (3) 実タンパク質分析へ適用、たとえば、細胞分化の際に発現するタンパク質の解析への応用

3. 研究の方法

- (1) 糸ゲルの最適設計と糸ゲル作製条件の最適化

これまではマルチフィラメント糸という多数の繊維が集まった糸を支持体として用いていたが、より操作性を向上させるため、それらの繊維を筒状に加工したメッシュチューブ（図 1）も検討した。また、従来の重合開始剤を用いる重合の他に、放射線重合法も検討した。

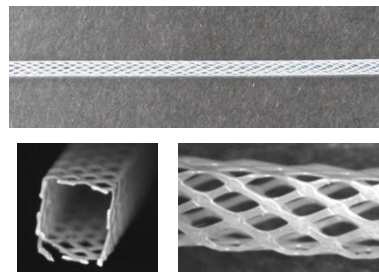


図1 メッシュチューブの一例

(2) IPG 法による pH 勾配安定化の検討

IPG 法は pH 勾配の安定性に優れている。そこで IPG 法を糸ゲル、メッシュチューブゲルに導入し、その作製法を検討した。さらに作製した IPG メッシュチューブゲルの分離性能を評価した。

(3) 実タンパク質分析への適用

低濃度糸ゲルを用いる 2-DE をラット肝臓幹様細胞抽出液などの実タンパク質試料の分析に適用した。

4. 研究成果

(1) 糸ゲルの最適設計と糸ゲル作製条件の最適化

①ゲルの支持体としてのメッシュチューブの性能評価

“メッシュチューブ”は糸がチューブ状に編まれ、さらなるゲルの低濃度化と操作性の向上が期待される。そこでゲルの支持体として新たに検討したところ、1.5%T までの低濃度ゲルを作製できた。これまでのマルチフィラメント糸を支持体とする 2.5%T の糸ゲルと比較すると、低濃度であるため、IEF に要する時間は約 20%短縮できた。また、メッシュチューブがゲルの形状を保たせやすいため、低濃度でも操作性は良好であった。

②放射線重合法による低濃度メッシュチューブゲルの作製

重合開始剤や触媒は、タンパク質の泳動に影響を与える可能性がある。そこで重合開始剤や触媒なしで重合可能な放射線（ガンマ線）を用いた重合法を検討した。メッシュチューブを支持体として用いても、マルチフィラメント糸の場合と同様 1.5%T までの低濃度のゲルを作製できた。ガンマ線を使用する場合、作製可能なゲルの濃度は支持体にほと

んど依存しないことが示唆された。

(2) IPG 法による pH 勾配安定化の検討

①IPG メッシュチューブゲルの作製

ゲルの新しい支持体としてメッシュチューブを用いた IPG ゲルの作製について検討した。メッシュチューブ用のゲル作製装置を作製し、モノマー溶液の送液条件を検討した。作製した IPG メッシュチューブゲルの pH を測定した結果を図 2 に示す。ゲル濃度 3.9%T、2.5%T のゲルともに、pH4.5~9.0 の勾配が形成できた。

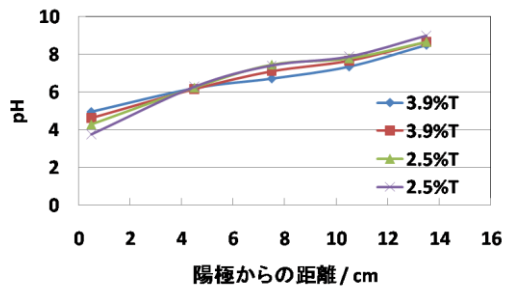


図2 IPG メッシュチューブゲルの pH 勾配

②IPG メッシュチューブゲルの分離性能評価

IPG 化した低濃度(2.5%T, 5.4%T)メッシュチューブゲルを、実際に等電点電気泳動に適用したところ、再現性よく分離できることがわかった。また、pI マーカータンパク質を試料として 2-DE 分離した結果を図 3 に示す。市販の IPG ストリップゲルや、IPG でない通常のアクリルアミドメッシュチューブゲルと比較して、同程度の分離結果であった。

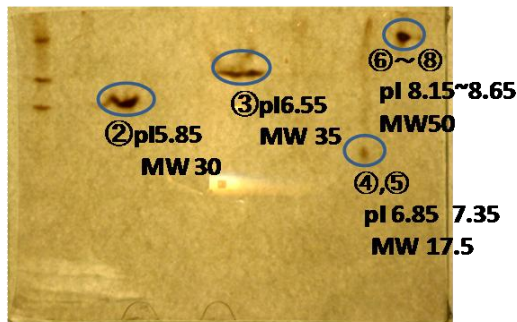


図3 IPG メッシュチューブゲルを用いた pI マーカータンパク質の 2-DE 分離

しかし、高分子量タンパク質を試料として 2-DE 分離したところ、市販の IPG ストリップゲルやアクリルアミドメッシュチューブゲル程の分離能は得られなかった。ゲル濃度や試料添加法等のさらなる検討が必要であることがわかった。

(3) 実タンパク質分析への適用

①糸ゲル 2-DE によるプロテオーム解析

ラット肝臓幹様細胞抽出液を実タンパク質試料として用い、糸ゲル 2-DE により分離させた。さらに 2D ゲル中で分離されたタンパク質を質量分析計で分析することにより、薬剤添加により発現量が增大するタンパク質の同定ができ、糸ゲル 2-DE システムがプロテオーム解析法として有用であることが示された。

②糸ゲル 2-DE システムによる細胞増殖と抑制の機序の解明への応用

培養日数の異なるラット肝臓幹様細胞の抽出液を実タンパク質試料とし、作製した低濃度糸ゲルを用いて 2-DE 分離した。さらに、ゲル内トリプシン消化と MALDI-TOF-MS 分析によりタンパク質を同定し、培養日数により発現量の異なるタンパク質を特定した。糸ゲル 2-DE システムをプロテオーム解析に適用することにより、細胞の増殖とその抑制の機序を解明できることが示唆された。

③低濃度メッシュチューブゲルによる実タンパク質試料の分離

低濃度メッシュチューブゲルを用い、培養細胞などの実タンパク質試料を 2-DE で分離した。メッシュチューブゲルは取り扱いがさらに容易であることが確認できた。しかし、IPG 化したメッシュチューブゲルを用いた場合、2-DE の分離スポットが明瞭でなかった。今後の検討課題である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

① K. Fujimura, T. Odake, H. Takiguchi, N. Watanabe, T. Sawada, Flow Injection Spectrophotometric Determination of Sub-ppm Silver(I) in a Strongly Acidic Solution Containing Concentrated Copper(II) Using a Pyridylazo Reagent, *Analytical Sciences*, 査読有, 27, 2011, 1197-1201, DOI: 10.2116/analsci.27.1197

② Tamao Odake, Toshihiko Saheki, Kazutoshi Kamezawa, Kozue Miyata, Hiromi Takiguchi, Hiroki Hotta, Koki Onda, Yasuaki Kojima, Jinxiang Li, Kin-ichi Tsunoda, Miniaturized two-dimensional gel electrophoresis of high-molecular-weight proteins using low-concentration multifilament-supporting gel for isoelectric focusing, *Journal of Electrophoresis*, 査読有, 53, 2009, 57-61, DOI: 10.2198/jelectroph.53.57

- ③ Toshihiko Saheki, Hitomi Ito, Akihiro Sekiguchi, Atsuyoshi Nishina, Toshihiro Sugiyama, Takashi Izumi, Itaru Kojima, Proteomic analysis identifies proteins that continue to grow hepatic stem-like cells without differentiation, *Cytotechnology*, 査読有, 57, 2008, 137-143, DOI: 10.1007/s10616-008-9122-7
[学会発表] (計12件)
- ① H. Tanaka, Y. Ichimura, R. Saito, H. Hotta, K. Tsunoda, T. Saheki, K. Onda, Y. Kojima, T. Odake, Application of mesh-tube gel to protein separation as a separation medium for isoelectric focusing electrophoresis, 2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (PACIFICHEM 2010), 2010年12月18日, Hawaii Convention Center (USA)
- ② 田中宏明, 小竹玉緒, 恩田紘樹, 小島祐明, 仲村尚典, 佐伯俊彦, 堀田弘樹, 角田欣一, メッシュチューブを支持体に用いた等電点電気泳動用 pH 固定化ゲルの開発とその特性, 日本分析化学会第59年会, 2010年9月15日, 東北大学川内北キャンパス (宮城県)
- ③ 向井裕輔, 斎藤健一, 岸美紀子, 和泉孝志, 杉山俊博, 小島至, 佐伯俊彦, 酪酸ナトリウムに対して可逆的に反応するラット肝臓幹様細胞のプロテオーム解析, 第82回日本生化学会大会, 2009年10月22日, 神戸ポートアイランド (兵庫県)
- ④ 市村祐子, 田中宏明, 小竹玉緒, 恩田紘樹, 小島祐明, 佐伯俊彦, 堀田弘樹, 角田欣一, pH 勾配固定化メッシュチューブゲルの作製とその二次元電気泳動システムへの適用, 第60回日本電気泳動学会総会, 2009年9月19日, 松本市中央公民館 (長野県)
- ⑤ 田中宏明, 市村祐子, 櫻井佳祐, 小竹玉緒, 恩田紘樹, 小島祐明, 佐伯俊彦, 堀田弘樹, 角田欣一, メッシュチューブを支持体に用いた等電点電気泳動用ゲルの開発, 東京コンファレンス2009, 2009年9月4日, 幕張メッセ国際会議場 (千葉県)
- ⑥ 清水祐毅, 浅野淳也, 佐伯俊彦, 電場中で低濃度のポリアクリルアミドゲルが変形する要因の解明, 第32回日本バイオレオロジー学会年会, 2009年6月4日, 桐生市市民文化会館 (群馬県)
- ⑦ 佐伯俊彦, 田島恵美, 片倉健太郎, 斎藤健一, 和泉孝志, 杉山俊博, 小島至, ラット肝臓幹様細胞における Prohibitin の翻訳後修飾, *Biochemistry and Molecular Biology (BMB)* 2008, 2008年12月11日, 神戸ポートアイランド (兵庫県)
- ⑧ 櫻井佳祐, 恩田紘樹, 佐伯俊彦, 小島祐明, 櫻井永一郎, 小竹玉緒, 堀田弘樹, 角田欣一, メッシュチューブを支持体に用いたタンパク質の等電点電気泳動用ゲルの開発と二次元ゲル電気泳動への応用, 第59回日本電気泳動学会総会, 2008年11月16日, 麻布大学百周年記念ホール (神奈川県)
- ⑨ 小竹玉緒, 植木悠二, 片貝秋雄, 玉田正男, 宮田梢, 櫻井佳祐, 堀田弘樹, 角田欣一, 電気泳動用低濃度ポリアクリルアミドゲルの放射線重合法による作製, 第3回高崎量子応用研究シンポジウム, 2008年10月10日, 高崎シティギャラリー (群馬県)
- ⑩ 小竹玉緒, 宮田梢, 植木悠二, 堀田弘樹, 片貝秋雄, 玉田正男, 角田欣一, 二次元電気泳動における一次元目低濃度ポリアクリルアミドゲルの放射線重合法による作製と評価, 日本分析化学会第57年会, 2008年9月10日, 福岡大学七隈キャンパス (福岡県)
- ⑪ Yuuko Ichimura, Keisuke Sakurai, Hiroaki Tanaka, Kouki Onda, Toshihiko Saheki, Yasuaki Kojima, Tamao Odake, Hiroki Hotta, Kin-ichi Tsunoda, An immobilized pH gradient gel supported by multifilament yarn for two-dimensional gel electrophoresis, 東京コンファレンス2008, 2008年9月4日, 幕張メッセ国際会議場 (千葉県)
- ⑫ 櫻井佳祐, 恩田紘樹, 佐伯俊彦, 小島祐明, 櫻井永一郎, 小竹玉緒, 堀田弘樹, 角田欣一, メッシュチューブを支持体とする等電点ゲルを用いる二次元電気泳動, 第69回分析化学討論会, 2008年5月15日, 名古屋国際会議場 (愛知県)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小竹 玉緒 (ODAKE TAMAO)
東京大学・大学院工学系研究科・研究員
研究者番号: 10301128

(2) 研究分担者

角田 欣一 (TSUNODA KIN-ICHI)
群馬大学・大学院工学研究科・教授
研究者番号: 30175468
佐伯 俊彦 (SAHEKI TOSHIHIKO)
群馬大学・大学院工学研究科・助教
研究者番号: 00241860
植木 悠二 (UEKI YUJI)
日本原子力研究開発機構・量子ビーム応用
研究部門・研究員
研究者番号: 50446415