アガロース・アクリルアミド 2次元電気泳動法

——細胞の全タンパク質分析のために

平林民雄, 大石正道, 宮崎淳一
筑波大学生物科学系

2次元電気泳動法は、タンパク質試料をその分子量と等電点によって分離する優れた方法である。このため、O'Farrell⁽¹⁾がこの方法を発表して以来、非常に多くの研究者がこれを利用してきた。筆者も筋肉タンパク質の分析のためにO'Farrellの方法を試み、それなりのデータを得た。しかし、ミオシン重鎖をはじめとする高分子量成分が分析できないこと、得られるpH範囲が予想したより狭いことなどがわかり、これを改善するために種種の試みを行なったが満足できず、最終的に完成したのが、1次元目にアガロースを用いる方法である。どのような目的のために2次元電気泳動法を行なうかによって、要求されるパターンの完成度が異なるが、ここでは分析にかけたすべてのタンパク質が定量的に分離されることを最終目標において話をすすめる。

もちろん、タンパク質分子の性質の多様性を考えると、このような目標は現実的ではないが、分子量、等電点以外に“含量”についてのデータも入手できれば、この電気泳動法がますます有用になるからである。先に筆者が発表した方法⁽²⁾をさらに改良し、pH 3.0~9.5、分子量50万までの分子がほぼ全量分析にかかるようにした。これまで試みた試料は動物の筋肉や各種器官、培養細胞、原生動物、粘菌、藻類などであるが、材料により試料調製法を少しずつ工夫する必要がある。また、ここで述べる実験条件をすべて順守しないでも各自の目的にかなうならば、より簡便な方法を使えるように*印の箇所の変法またはコメントを文末につけ加えておくので利用していただきたい。

準備

1. 装置

- a. 定電流定電圧電源： 1,000 V 定電圧, 100 mA
定電流の出せるもの。それぞれ1次元目と2次元目

に使用する。

- b. 4°C の恒温室か冷蔵庫： 1次元目の泳動に使用する。
- c. ペリスタポンプ： アガロースゲルの TCA 処理と水洗に使用する。たとえば太洋科学の 1500 N 型など。
- d. グラジェンター： 2次元目のアクリルアミドに濃度勾配をつけるために使用するが、なければ均一濃度ゲルを使用すればよい。
- e. シェイカー： ゲル脱色用、なくてもよい。
- f. ディスク泳動槽： 市販のディスク泳動槽の支えを長くして、26 cm のガラス管が使用できるようにしたもの*¹。
- g. 垂直平板泳動槽： ここでは幅 190 mm, 長さ 140 mm, 厚さ 1.4 mm のゲルを作製する。

2. 器具

- a. 等電点電気泳動用ガラス管： 内径 2.6 mm, 長さ 260 mm のガラス管を3本用意し、内径が小さくならない程度に両端を炎でかるく焼く。
- b. ゲル処理用ガラス管： 内径 5 mm, 外径 7 mm, 長さ 250 mm のガラス管を3本用意し、両端をかるく焼く。この両端に、図1のような部品をつける。アガロースゲルが水流によって1つの穴をふさいでも他の穴から液が流れる。
- c. ゲル運搬用ガラス管： 内径 3.2 mm, 長さ 30 cm のガラス管の両端をかるく焼き、これに 5 ml 用キャップをつける。これを用いて水中のアガロースゲルを吸いとり2次元目の泳動槽に運ぶ。

3. 試薬など

- a. 等電点電気泳動用アガロースゲル： 図2に従っ

図 1 ■ アガロースゲルの固定・洗浄用ガラスチューブの作り方

ガラス管，シリコンチューブ，エクセルチップ，ポリエチレンチューブ，ビニールチューブを用いて図のような工夫をし，これをガラス管の両端につけ，直列に接続して使用する．エクセルチップに 2 箇所以上の穴があいていて，1 つがアガロースで止められても液は他の穴から流れるようになっている．

て調製．

b. 抽出液 1 :

尿素	3.00 g	} 蒸留水を加えて 10 ml とする．
チオ尿素	1.55 g	
メルカプトエタノール	0.013 ml	
ピロリン酸ナトリウム	0.045 g	
(20% ノニデット P40 1 ml)*2		

c. 抽出液 2 :

塩酸グアニジン	15.28 g	} 蒸留水を加えて 20 ml とする．
0.5 M トリス・塩酸 (pH7.5)	4 ml	
メルカプトエタノール	2 ml	
ピロリン酸ナトリウム	0.089 g	

d. 透析液 :

尿素	90.1 g	} 蒸留水を加えて 300 ml とする．
チオ尿素	22.8 g	
メルカプトエタノール	0.5 ml	
ピロリン酸ナトリウム	1.34 g	

e. 上部液 :

尿素	2.4 g	} 蒸留水を加えて 10 ml とする．
チオ尿素	0.77 g	

f. 1 次元目の電極液 :

酸性用 : D, L-アスパラギン酸 1.33 g を蒸留水で 250 ml とする．アルカリ性用 : 水酸化ナトリウム 2 g を蒸留水で 250 ml とする．

g. 固定液 1 : 10% TCA・5% スルフォサリチル酸液

h. SDS-ポリアクリルアミドゲル : 図 3 に従って調製する．

i. 1% アガロース : アガロース I (和光) 0.1 g を蒸留水 10 ml に溶かす．

j. 2 次元目の電極液 :

トリアミノメタン	30.28 g	} 蒸留水を加えて 1 l とする．
グリシン	143.1 g	
SDS	10 g	

アガロース IEF (ファルマシア)	0.04 g
ソルビトール (和光・一級)	0.48 g
蒸留水	2 ml (1.82 ml)*2
—混合して熱湯中で溶解させる—	
尿素 (特級)	1.20 g
チオ尿素 (特級)	0.30 g
—良く混合して完全に溶解させる—	
(20% ノニデット P40, 0.18 ml)*2	
—分注する—	
0.3 ml (A)	1.8 ml (N) 0.9 ml (B)
ファルマライト	
pH 2.5~5	15 μ l — —
pH 3~10	— 120 μ l — —
pH 4~6.5	— 60 μ l — —
pH 8~10.5	— — 45 μ l
ゲルの長さ	20 mm 105 mm 55 mm
pH 領域	酸性 中性 塩基性

図 2 ■ 等電点電気泳動用アガロースゲルの調製法

この図に従って，3 本のゲルが作られる．() 内はノニデット P40 を使用する場合の値を示す．

分離用ゲル	12%溶液	20%溶液
0.75 M トリス・塩酸 pH 8.8	9.75 ml +	9.75 ml +
50% アクリルアミド, 1.33% ビスアクリルアミド	4.68 ml +	7.80 ml +
20% SDS	0.86 ml +	0.86 ml +
10% TEMED	0.2 ml +	0.2 ml +
蒸留水	4.01 ml	0.89 ml
	↓	↓
	18.5 ml +	18.5 ml +
5% 過硫酸アンモニウム	0.3~0.15 ml	0.3~0.15 ml
濃縮用ゲル		
0.25 M トリス・塩酸, pH 6.8		3 ml +
50% アクリルアミド, 1.33% ビスアクリルアミド		0.36 ml +
20% SDS		0.3 ml +
10% TEMED		0.06 ml +
蒸留水		2.16 ml
5% 過硫酸アンモニウム		0.13 ml

図 3 ■ 12~20% 濃度勾配ゲルの調製法
 SDS 溶液は室温にストックする。過硫酸アンモニウム液は使用のたびに調製する。他の試薬は 4℃ に保存する。

k. SDS 処理液：

0.25 M トリス・塩酸 (pH 6.8)	25 ml	} 混合する.
SDS	2 g	
グリセリン	10 ml	
メルカプトエタノール	5 ml	
プロモフェノールブルー	0.02 g	
蒸留水	58 ml	

1. 固定液 2：

メタノール (1 級)	450 ml	} 混合する.
酢酸 (1 級)	100 ml	
蒸留水	450 ml	

- m. ピクリン酸ナトリウム中性液： ピクリン酸 (和光) 27 g を約 800 ml の蒸留水に入れ水酸化ナトリウムを加え、攪拌しながらピクリン酸を溶かす。完全に溶けた時ほぼ pH 7 となり、全体を 1 l にする。
 n. 染色液： 100 ml の固定液 2 に 0.2 g のクーマシーブリアントブルーを溶解させ、これに 300 ml のピクリン酸ナトリウム中性液を加える。

実験操作

- ① 図 2 のゲルの長さに従って、器具 a のガラス管

の下端から 20 mm, 105 mm, 55 mm の間隔でマジックインキで印をつける。

- ② 透析チューブ (36/32) を約 5 cm に切り、ハサミで 2 枚にする。この 1 枚を ① のガラス管下端にあてがい、包むようにして、輪ゴム (小) でとめる。

- ③ 透析膜を下端につけたガラス管を装置 f の泳動槽につける。

- ④ 図 2 に従ってアガロース IEF とソルビトールを蒸留水に入れ、熱湯中で溶解させ、すぐに尿素・チオ尿素混合粉末をこれに投げこみ、完全に溶解させる*3。

- ⑤ これを 3 本の試験管 A (酸性), N (中性), B (塩基性) に図 2 に従って分注する。

- ⑥ 図 2 に従って、A, N, B にそれぞれのファルマライトを入れ、よく混合する。N の試験管のみ 2 種のファルマライトを混合することになる。

- ⑦ 5 ml の注射管に輸血針 (中) をつけ、この先に約 40 cm のポリエチレンチューブ (サイズ 4) をとりつけたもので A の液を吸いとる。

- ⑧ ③ でとりつけたガラス管上部からポリエチレンチューブをさし込み、下端の透析膜まで入れる。ここで注射筒から A 液を押し出し、膜から 20 mm の印のところまで液を入れ、ポリエチレンチューブを抜きとる。このようにして、3 本のガラス管の下端に A 液を注入する。気泡が残らないように注意する。

- ⑨ 次に、同じ注射筒で N の液をとり、ガラス管の 105 mm の印まで液を入れる。

- ⑩ 同様にして、B の液をとり、55 mm の印まで入れる。3 種の液の界面は乱れても構わない。

- ⑪ このように下から A, N, B の順で液を注入したものに試薬 e の上部液を 1 cm ほど積む。

- ⑫ これを泳動槽とともに 4℃ の部屋に入れ、3~4 時間、できれば一夜放置して、アガロース IEF を固める。

- ⑬ タンパク質分解酵素などの関与が心配な場合には、試薬 c の抽出液 2 で試料をホモジェナイズする。筋肉の場合には湿重量の 20~40 倍の抽出液を使用する⁽³⁾。

- ⑭ このホモジェネイト 1~3 ml を透析チューブに入れ、試薬 d の液に 0℃ で透析する。約 70 ml の透析液を用いて、十分に攪拌しながら、45 分毎に 3 回交換する。

- ⑮ 分解酵素が心配でない場合には試薬 b の液でホモジェナイズする。

⑮ ⑭で透析した試料または⑮のホモジェネートを約 20,000×g で 15 分間遠心する*4。

⑯ リピッドをできるだけとらないように上清を吸い取る（この 20~40 ml を 1 本のゲルにかける）。

⑰ ⑫において固まったアガロースを泳動槽とともに室温にもちだし、上部液をチューブまたはティッシュペーパーで吸い取る。

⑱ このアガロースゲル上に、⑯の試料をガラス管壁を伝わせながら入れ、さらにその上に試薬 e の液を上端まで満たす。

⑳ 試薬 f の電極液を用いてディスク泳動槽をセットする。上槽がアルカリ性側、下槽が酸性側である*5。

㉑ 4℃ において 500 V×25 時間泳動を行なう*6。

㉒ 器具 b のゲル処理用ガラス管をまず 1 本、ベリスタポンプに接続し、試薬 g の固定液（100 ml）を吸い上げて満たしておく。このガラス管の一方の端は、シリコンチューブとエクセルチップの間で離しておく。したがって、固定液の入った器からベリスタポンプを経て、ガラス管の中まで固定液が満たされていることになる。

㉓ ㉑で完了したディスク泳動のガラス管を泳動槽からはずし、ガラス管の上端を指で止めながら下端の透析膜を取り除く。この下端を㉒のガラス管のシリコンチューブにさしこみ、ベリスタポンプを逆転させて、アガロースを固定液の中に吸いこませる。

㉔ 2 本目のゲル処理用ガラス管をこれに接続し、ベリスタポンプを回転させて、固定液を満たし、同様の手順で、2 番目、3 番目のゲルをゲル処理用ガラス管に導く。このように 10 本以上を直列に接続しても良い。

㉕ すべてのゲルを直列に接続して、その先をもとの固定液の中に導き、ベリスタポンプにより液を循環させ、約 1 時間処理する。ノニデット P 40 を使用しない場合には、この段階でタンパク質のバンドが現われ、暗視野下で写真におさめることができる⁽²⁾。

㉖ 固定液を蒸留水に交換して、さらに 1 時間循環させアガロースゲルを洗う。

㉗ 図 3 に従って、分離ゲルの 12% と 20 % 溶液をつくり、装置 d のグラジエーターを用いて濃度勾配をもった平板ゲルを調製する⁽⁴⁾。過硫酸アンモニウムを入れると同時に平板ゲル装置に流しはじめ、流し終った直後に上に蒸留水を積む。この後 10~15 分でゲルが固まるように、過硫酸アンモニウムの量を気温にあわせて、

0.3~0.15 ml の範囲で調節すると良い。

㉘ 約 1 時間後、上部の蒸留水を除き、その後に図 3 の濃縮用ゲル液を入れる。過硫酸アンモニウム投入後すぐよく混合して、分離用ゲルの上に流しこみ、蒸留水を上に積む。ゲル化して界面ができたところで蒸留水を交換して、また十分蒸留水を満たしておく。

㉙ ㉖で還流の終ったアガロースゲルを蒸留水の入った広い器の中に流しだす。

㉚ このアガロースゲルを器具 c のガラス管を用いて水とともに吸いとり、この管に入れて運ぶ。このアガロースゲルを㉘のアクリルアミドゲル上の蒸留水の中に流しだし、アガロースゲルが落ち着いたところで蒸留水をピペットで吸いとり、除く。少量残った水も濾紙などで吸い取る。

㉛ このアガロースゲルの両端の空所と中央部の上に、試薬 i のアガロース液を少量流しこみ、固化させ固定する。

㉜ 試薬 j の電極液を 10 倍に稀釈して、2 次元目の泳動に使用する。

㉝ アガロースゲル上にも電極液を満たし、電源も接続して、スイッチを入れればすぐ泳動が始められるようにする。

㉞ 試薬 k の SDS 処理液をピペットでアガロースゲルの上に流しこみ、深さ約 5 mm にする。

㉟ すぐ電源スイッチを入れ、色素が分離用ゲルに入るまでは低電流（たとえば 30 mA）で、それ以後は高電流（たとえば 60 mA）で泳動を行なう。

㊱ 色素が下槽に流出したところで泳動を止め、ゲルをとりだして、試薬 l の固定液 500 ml で 30~60 分、3 回振盪しながら洗う⁽⁵⁾。

㊲ 続いて試薬 m の液で約 30 分洗った後、試薬 n の染色液で一夜染色する。

㊳ 翌日、何回も交換しながら蒸留水でゲルを洗う。黄色がなくなれば脱色が完了。

㊴ 広い器にアラビアゴムの粉末をひき、その上に脱色の終ったゲルを載せ、ゲルの上にも同程度の粉末をかける。この上にサララップをかけて気泡を追いだし、3~4 時間放置する。

㊵ ゲルを軽く水洗し、ぬめりを除いた後、周囲を固定した 2 枚のセロファン紙に挟んで乾燥する*7。

コメントと変法

- *1 1次元目の泳動に短いガラス管を用いても良いが、酸性、中性、塩基性のゲルの割合(図2)は変えないほうが良い。また中性のゲルのみを用いても等電点泳動は可能であるが、かけた試料の入りをよくするために塩基性ゲルを5~10 mm 積むのが良い。
- *2 ノニデット P 40 を1次元目のゲルおよび抽出液に入れる場合には、図2と試薬 b の() 内の値を使用する。この場合、㊸の固定においてゲル全体が白濁する。さらに、㊸において蒸留水の代わりに10 倍に希釈した試薬 g の固定液で30 分間還流する。長時間還流したり、蒸留水で還流するとタンパク質が流出してしまう。
- *3 このとき良く溶解させるために、もう一度熱湯中に入れることは尿素の分解を避けるためやってはいけない。
- *4 透析した試料やホモジェネートを10 万×g で30 分間遠心しその上清を使用すると、リピッドが比較的良好に除かれ、分析にかかるタンパク量が多くなる。
- *5 分析にかかる率をよくするためにはアルカリ性側から試料をかけるのが良いが、どうしても酸性側からかけたい場合はアガロース IEF のゲルを逆に積むか、または上述の順序で積んでゲル化した後、ガラス管の上端にも透析膜を張り、両端の透析膜に針で穴を

あけ、逆にしてゲルをずらせば、逆積みにしたゲルができる。もちろん、この場合上槽には酸性液を入れる。酸性側からかける場合、そのパターンは見た目には美しいが、かなりのタンパク質が変

図 4 ■ 2次元電気泳動法の応用例
(a)ニワトリ胸筋、(b)ニワトリ心室、(c)藻類(ラフィド藻)
動物組織の場合は湿重量の20~40 倍の抽出液で、植物の場合には5~10 倍の抽出液で抽出し、これを40~80 μ l 分析にかけるのが良い。タンパク量にして100~200 μ g に相当。

性してゲル上端に止まってしまうので、定量的には信用できない。

*6 ここで用いた系では $500 \text{ V} \times 25$ 時間が最良であったが、他に $500 \text{ V} \times 21$ 時間 + $2,000 \text{ V} \times 1$ 時間も試みた。しかし特に良くはならなかった。

*7 この乾燥法はアクリルアミドゲルが壊れることなく、ガラスのように透明に乾燥できるので、スポットの画像解析による定量には適しているが、オートラジオグラフィーによる研究には古来の濾紙に貼りつけて乾燥する方法がよい。

変法——マイクロゲルのつくり方

アガロースゲルは扱い方さえ心得ていれば予想外に丈夫なゲルである。上述のマクロゲルでは通常 $150 \sim 200 \mu\text{g}$ のタンパク質の分析を行なうが、試料の少ないときは、さらに細いヘマトクリット管を用いてマイクロゲル泳動も可能である。ヘマトクリット管の下端の径が約半分になるように炎の上で焼き、毛管現象を利用して、下端からまずB液、次にN液、A液と吸いあげる(図2)。これを横に倒したまま冷蔵庫中で固める。上部液や試料の注入にはヘマトクリット管で作ったキャピラリーを用いる。1次元目の泳動後は上端からゲルを押し出し、固定液1の中に入れる。細いので液の還流は不要である。以後はマクロゲルとまったく同様に行なえる。

応用例

図4はニワトリ胸筋(a)と心筋(b)および藻類(c)の例である。左上端に残っているタンパク質の量は比較的少なく、図4(a)の左側に入れた1次元泳動パターンと対比すれば、ほとんどすべての成分が分析できていることがわかる。藻類(c)の場合には中性および弱酸性域に成分が集中しているが、広いpH範囲は達成されている。

このような2次元パターンを用いて、次のような仕事が可能である。

(1) 1つのスポットは $1 \sim 20 \mu\text{g}$ のタンパク質を含んでいるので、これを切りだしてアミノ酸分析やペプチドマップを作製することができる。

(2) スポットを切りだして、ゲルを生理的溶液に透析した後、細かくつぶしてウサギに注射すれば、このタンパク質に対する特異抗血清を調製できる。

(3) 定性的にも定量的にもほとんどすべての成分が分析されるので、特異成分の検出や成分の量的変動を正確に記載できる⁽⁶⁾。

(4) クーマシー染色でも $200 \sim 300$ のスポットが検出できるので、組織や細胞の成分の種間差を比較できる⁽⁷⁾。

*

実験方法の改良・開発はまさに終わりのない仕事である。その中のほんの小さな項目でも、思いつくほとんどすべての試みを行なって失敗してからでないと成功に至らなかった。この意味で、上述の方法は筆者らの多くの失敗の成果である。ほとんど素人である卒業研究の学生でも、数回練習すれば一応満足できるパターンを作ることができるので、この方法自体はさほど難しいものではない。試料の調製方法についてはなお一層の改良を加え、より多くの材料に適した方法をあみださなければならぬが、今のところ、本稿に述べた2法が最良と思われる。読者諸氏が各自の材料で本法を試みていただけることを期待する。

文献

- 1) P. H. O'Farrell: *J. Biol. Chem.*, **250**, 4007 (1975).
- 2) T. Hirabayashi: *Anal. Biochem.*, **117**, 443 (1981).
- 3) T. Hirabayashi, R. Tamura, I. Mitsui & Y. Watanabe: *J. Biochem (Tokyo)*, **93**, 461 (1983).
- 4) U. K. Laemmli: *Nature*, **227**, 680 (1970).
- 5) J. L. Stephano, M. Gould & L. Rojas-Galicia: *Anal. Biochem.*, **152**, 308 (1986).
- 6) S.-I. Hirai & T. Hirabayashi: *Devel. Biol.*, **97**, 483 (1983).
- 7) J.-I. Miyazaki, K. Sekiguchi & T. Hirabayashi: *Biol. Bull.*, **172**, 212 (1987).