[シンポジウム 2 : 電気泳動法の教育ツールとしての活用]

医学教育現場での活用

藏 満 保 宏

SUMMARY

Electrophoresis techniques have been used not only for scientific research, but also for scientific education. At Yamaguchi University School of Medicine, our students have several chances to learn electrophoresis techniques. Second year medical students are required to learn biochemical laboratory techniques for doing future research. They learn agarose gel electrophoresis for DNA analysis and cellulose acetate membrane electrophoresis for serum separation. This university offers a unique program for education, called "self-developing course". During this four month course, students can belong to whatever department or institute they wish. Some students choose our laboratory where they perform basic or advanced experiments that they plan by themselves. Mainly they investigate proteomics or signal transduction. For these experiments, electrophoresis techniques, such as two-dimensional gel electrophoresis (2DE), Western blotting and 2D-Western blotting, are indispensable. In addition, all graduate students are instructed in electrophoresis techniques.

Key words: electrophoresis, education, Western blotting, 2DE, SDS-PAGE.

はじめに

現在, 電気泳動法は医学, 理学, 薬学, 農学, 歯学等の研究の場のみならず, 教育の場においても必須のツールとなっていると考えられる. このシンポジウムでは, 山口大学医学部での教育の現状の中で, どのように電気泳動が用いられているのかを紹介したい. 山口大学医学部での教育における電気泳動のツールとしての活用の機会は, 大きく 1) 医学部医学科 2 年生を対象とした生化学実習, 2) 医学部医学科 3 年生を対象とした自己開発コース, 3) 医学部保健学科 4 年生を対象とした特論実習, 4) 大学院学生を対象とした研究活動の四つである. 下記にそれぞれの具体的な状況を紹介する.

生化学実習

山口大学医学部医学科では, 2 年生の 10 月に 10 回 (1 回当たり 4 時間から 6 時間, 2 回の講義等を含む) 生化学実習を行っている (Fig. 1). その内容は, 実習 1) 滴定曲線と

緩衝液の調製 (基本実習), 実習 2) 蛋白質の定量法 (基本実習), 実習 3) 大腸菌 DNA の分離と定量 (応用実習), 実習 4) プラスミドおよび染色体 DNA の電気泳動と形質転換 (応用実習), 実習 5) 尿中窒素成分の分析 (応用実習), 実習 6) 酵素反応速度論 (応用実習), 実習 7) 脳における解糖系 (応用実習), 実習 8) 血清脂質および蛋白質の分析 (応用実習) の 8 つの項目を履修することになっている. この中で実際に電気泳動を用いる実習は, 実習 4) プラスミドおよび染色体 DNA の電気泳動と形質転換と, 実習 8) 血清脂質および蛋白質の分析の二項目である.

実習例 (1) プラスミドおよび染色体 DNA の電気泳動と形質転換

この実習 4 は, 大腸菌のゲノム DNA, および制限酵素 EcoR I で切断したプラスミド DNA をアガロースゲル電気泳動で分離し, DNA の解析を行ない, さらに大腸菌にプラスミド DNA を導入して形質転換を行う実習である. 電気泳動の内容としては, 実際に自分で粉末のアガロースから

Electrophoresis for the education in the school of medicine.

Yasuhiro Kuramitsu; 山口大学医学部分子感知医科学・生化学

Correspondence address: Yasuhiro Kuramitsu; Department of Biochemistry and Biomolecular Recognition, Yamaguchi University School of Medicine, 1-1-1 Minami-kogushi, Ube, Yamaguchi 755-8505, Japan.

第 55 回日本電気泳動学会総会・シンポジウム

(受付 2005 年 3 月 18 日, 受理 2005 年 5 月 11 日, 刊行 2005 年 6 月 15 日)

0.8%のアガロースゲル(TAE緩衝液)を加熱して作製させ、制限酵素EcoR Iで切断したpUC18プラスミドDNAと未処理のpUC18プラスミドDNA、そしてサイズマーカー用DNAをアプライして100Vで30分間電気泳動で分離させている(Fig. 2)。電気泳動終了後にゲルの写真をトランスイルミネーターの下で撮影し、写真を見て考察するものである(Fig. 3)。

実習例(2) 血清脂質および蛋白質の分析

この実習8は薄相クロマトグラフィーによるヒト血清脂質の分離・同定とセルロースアセテート膜電気泳動によるヒト血清タンパク質の分離・同定を行う実習である。ヒト血清脂質としてはコレステロール、トリアシルグリセロール、ヒト血清脂質、コレステロールエステルを用いている。ヒト血清タンパク質としては健康人の血清を用いている。バルビタール緩衝液に浸したセルロースアセテート膜上に0.8 μ lの血清をウルトラマイクロピペットを用いて塗布して定電圧(150V)で電気泳動を行う。ボンソー3Rで染色・

Fig. 1. Biochemistry laboratory for medical students.

Fig. 2. Agarose electrophoresis for plasmid and genomic DNA.

脱色した後で電気泳動パターンをスケッチして、それぞれのバンドがアルブミン、 α 1グロブリン、 α 2グロブリン、 β グロブリン、 γ グロブリンに相当するかを考えてもらうものである(Fig. 4)。

自己開発コース

自己開発コースとは、山口大学医学部医学科独特のカリキュラムで、3年生の7月末から12月一杯の5ヶ月間に渡って、自分で決めたコース、つまり学内基礎・臨床講座での研究、学内の附属病院での体験臨床修練、他大学の基礎・臨床講座での研究(例:岡山大学等)、または自分で見つけてきた国内外でのボランティアや研究室での体験実験など何でもありのコースである。この自己開発コースで当教室を選択した学生には5ヶ月間、一つのテーマをもとに研究する。5ヶ月間(8月は夏休み中なので実質は4ヶ月

Fig. 3. The result of agarose electrophoresis for plasmid and genomic DNA.

Lane 1; DNA ladder
Lane 2; undigested plasmid
Lane 3; digested plasmid
Lane 4; DNA ladder
Lane 5-13; genomic DNA

Fig. 4. The result of cellulose acetate membrane electrophoresis for serum.

間) と短いので、概ね質量分析を用いたタンパクの同定までは行えないが、細胞培養、タンパク質抽出、SDS-PAGE、ウェスタンブロットング、二次元電気泳動 (2DE) 等の実験技術の習得はひととおりできるようになる。2003 年度の 1 例を挙げると、マクロファージ遊走阻止因子 (MIF) のシグナル伝達機構の解明に向けて、MIF でマウスマクロファージ細胞株 RAW 細胞を刺激した際にリン酸化されるタンパクの同定を最終目標に実験した。リン酸化チロシン抗体 4G10 を用いたウェスタンブロットング、λ ホスファターゼ処理により脱リン酸化させたタンパクのサンプルを用いた 2DE のパターンからリン酸化タンパクの解析等を行った。残念ながら同定まではできなかったが、MIF のシグナルに関与すると考えられるいくつかのリン酸化タンパクが見つかった。2004 年度の 1 例を挙げると、食道癌患者 18 例の癌切除術の際に入手した癌部組織と非癌部組織からタンパク質を抽出後、2DE により分離し、癌組織において発現が増強するタンパク質スポットと発現が減弱するタンパク質スポットを 2DE 画像解析ソフトウェアによって特定、in gel digestion の後、質量分析計を用いてタンパク質を同定する手法を学習した。下記にここ 3 年間当教室で自己開発コースを行った学生のテーマを列記する。

2004 年度 : (1) 食道癌組織と非癌部組織のプロテオーム解析, (2) 熱ショック処理後の lipid raft のプロテオーム解析, (3) stathmin の機能プロテオミクス

2003 年度 : (1) MIF のシグナル伝達機構の解析, (2) アルコールの T 細胞アポトーシスへの影響, (3) ヘリコバクターピロリ菌の病原因子 CagA の機能プロテオミクス

2002 年度 : (1) 熱ショックによる stathmin リン酸化の詳細な検討

特論実習

特論実習とは、山口大学医学部保健学科 4 年生の 5 月中旬から 7 月末までの 2 ヶ月半に渡って学内基礎・臨床講座にて研究を行うコースである。2 ヶ月半と期間が短いので、体験研究程度の内容ではあるが、細胞培養、タンパク質抽出、SDS-PAGE、ウェスタンブロットング、2DE 等の実験技術の習得はひととおりできるようになる。下記にここ数年間で当教室で特論実習を行った学生のテーマを列記する。

(1) CagA 結合タンパク質の同定, (2) lipid A 誘導体 ONO-4007 のシグナル伝達の解明¹⁾, (3) TNFα 抵抗性に関与するタンパク質の同定²⁾

大学院教育

大学院博士過程医学研究科は 4 年間の過程であるが、臨床講座から当教室に出向して来る大学院生の場合、実質的な研究期間は 2, 3 年程度になる。医学博士取得のためこの期間に英文の原著論文を 1 報以上書く必要があるため、助手等の教官と同じレベルの研究を実施する。研究開始後直ちに、細胞培養、タンパク質抽出、SDS-PAGE、ウェスタンブロットング、2DE、質量分析等の実験技術を習得する。当教室では、メインテーマである疾患プロテオミクス解析 (肝細胞癌、膵臓癌、食道癌、口腔癌等のプロテオミクス解析) を大学院生に割り振って行わせている。これは手術で

Table 1. The projects for the graduate students in our lab

時期と期間 : 博士課程の 4 年間で基本であるが、臨床講座から来ている学生の場合は 2 年間程度
現在在籍中大学院生の研究内容 :

- 1) C 型肝炎由来肝癌組織のプロテオーム解析
(*Proteomics* 誌に 3 報受理^{3~5)}, 2 報投稿中)
- 2) 膵癌組織のプロテオーム解析
(*Proteomics* 誌に 1 報投稿中)
- 3) 癌の悪性化のプロテオーム解析
(*Proteomics* 誌に 1 報受理⁶⁾)
- 4) TNF 感受性に関与するタンパク質の 2DE と LC-MS/MS による同定
(*J. Electrophoresis* 誌に 1 報受理)
- 5) 口腔扁平上皮癌組織のプロテオーム解析
- 6) EBV 感染胃癌細胞のプロテオーム解析
- 7) C 型肝炎ウイルスコアプロテインの肝発癌への影響のプロテオミクスの解明
- 8) SCC 抗原 (serpin) の機能プロテオミクス解析
- 9) 抗癌剤 gemcitabine の標的タンパク質の 2DE と LC-MS/MS による同定
- 10) LPS と lipid A 誘導体刺激によりマクロファージ細胞質内での発現が増強してくるタンパク質の 2DE と LC-MS/MS による同定
- 11) 熱ショック処理により細胞内に発現が増強するタンパク質の局在の 2DE と LC-MS/MS による同定

入手した癌組織と非癌部の組織から抽出したタンパクの発現パターンを 2DE によって比較する。その後、発現に相違のあるスポットを質量分析によって同定し、発癌に関与するタンパク質、診断のマーカーとなりうるタンパク質、創薬のターゲットとなりうるタンパク質を特定することを目的としたプロジェクトである。大学院生は期限内に研究の目処をつけ、その内容を英文による論文としてまとめなければならないという大命題があるため、この大学院教育によってかなり研究は進んでいる。このプロジェクトの核となる技術は電気泳動法の 2DE とウェスタンブロットングである。論文を発表して学位を取得する段階では、大学院生の電気泳動における技術は我々教官に匹敵するまで向上している場合もあり、最適な教育であると評価している。Table 1 に現在当教室で大学院生が筆頭となって行っているプロテオミクス研究をまとめた。

おわりに

- 1) 医学部医学科生化学実習で、8 項目のうち 2 項目に電気泳動を必要としている。
- 2) 医学部医学科自己開発コースでは全ての項目で電気泳動を用いている。
- 3) 医学部保健学科特論実習でも全ての項目で電気泳動を用いている。
- 4) 当講座ではプロテオーム解析をメインとしていることもあり、大学院博士過程の学生全ての研究遂行に電気泳動を用いている。

文 献

- 1) Saito Y, Kuramitsu Y, Arai H, Kato Y, Fujimoto M, Ita M, Hayatsu Y, Shinozaki F, Nakamura K. A signaling pathway by a new synthetic lipid analog, ONO-40007, in RAW264.7 cells. *Anti-Cancer Drugs* 2002;13(10):1069–1075.
- 2) Kuramitsu Y, Fujimoto M, Tanaka T, Ohata J, Nakamura K. Differential expression of phosphatidylethanol-amine-binding protein in rat hepatoma cell lines: analyses of tumor necrosis factor- α -resistant cKD8-8/11 and -sensitive KD8-8/YK cells by two-dimensional gel electrophoresis. *Electrophoresis* 2000;21(3):660–664.
- 3) Takashima T, Kuramitsu Y, Yokoyama Y, Iizuka N, Fujimoto M, Nishisaka T, Sakaida I, Okita K, Oka M, Nakamura K. Overexpression of α enolase in hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma: association with tumor progression as determined by proteomic analysis. *Proteomics* 2005;5(6):1686–1692.
- 4) Yokoyama Y, Kuramitsu Y, Takashima T, Iizuka N, Toda T, Terai S, Sakaida I, Oka M, Nakamura K, Okita K. Proteomic profiling of proteins decreased in hepatocellular carcinoma from patients infected with hepatitis C virus. *Proteomics* 2004;4(7):2111–2116.
- 5) Takashima T, Kuramitsu Y, Yokoyama Y, Iizuka N, Toda T, Sakaida I, Okita K, Oka M, Nakamura K. Proteomic profiling identification of heat shock protein 70 family members as biomarkers for hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma. *Proteomics* 2003;3(12):2487–2493.
- 6) Hayashi E, Kuramitsu Y, Okada F, Fujimoto M, Zhang X, Kobayashi M, Iizuka N, Ueyama Y, Nakamura K. Proteomic profiling for cancer progression: Differential display analysis for the expression of intracellular proteins between regressive and progressive cancer cell lines. *Proteomics* 2005;5(4):1024–1032.