

タンパク質分析のための 全自動二次元電気泳動システムの開発

Fully Automated Two-Dimensional Electrophoresis System for Protein Analysis

高橋克佳*¹ 丸尾祐二*¹ 三枝理伸*² 松島俊幸*³ 鵜沼豊*¹
Katsuyoshi Takahashi Yuji Maruo Michinobu Mieda Toshiyuki Matsushima Yutaka Unuma

要 旨

タンパク質を等電点および分子量の違いにより二次元的に分離するための全自動二次元電気泳動装置および検出システムを開発した。従来、タンパク質を網羅的に解析する二次元電気泳動法は、操作が煩雑で分析に長い時間を要するという課題があったが、本開発では、二次元電気泳動の自動化および分析時間の短縮に成功し、操作の簡易化、高再現性を実現した。今後は本システムを用いた個人の健康状態の把握および病気の診断用途への展開が期待される。本稿では、二次元電気泳動の自動装置および分析用チップ、また分離されたタンパク質を高感度に検出する方法について開発を行った結果を報告する。

Fully automated two-dimensional electrophoresis device and detection system for protein analysis have been developed. Two-dimensional electrophoresis has been widely used for protein analysis, but its experimental procedures are complicated and demand long analysis time so far. To solve these problems, we succeeded in the automation of two-dimensional electrophoresis and shortening analysis time with high reproducibility. In the future, it is expected that this system will be used for individual checkup and diagnosis. This paper describes the outline of the fully automated two-dimensional electrophoresis device and detection system for protein analysis.

まえがき

近年、高齢化社会を迎えるにあたり、予防医学、健康管理といった個々人の健康への関心が高まっている。健康状態の把握、診断に、従来の医師による診断の他に、バイオテクノロジー技術を用い、個々の体内に存在するDNA、RNA、タンパク質などの生体分子を測定する研究が盛んに行われている。ヒトゲノムプロジェクトにより人を構成する遺伝子の種類（塩基配列）は明らかになったが、各遺伝子と疾患との関連性は未だ不明な点が多いのが現状である。また、生体内で実際に機能を担っているのはタンパク質であり、DNAやRNAの遺伝情報を調べるだけでは、実際に進行している病気の状態を的確に捉えることができないことも指摘されている。そこで我々は、測定ターゲットをタンパク質に定め、タンパク質を測定・解析

するシステムの開発を行った。体内に存在するタンパク質の種類は数千～数万種類に上ると言われており、タンパク質を解析するには、まず、タンパク質を個々の性質によって分離する技術が必要である。通常この目的で二次元電気泳動と呼ばれる手法が利用される¹⁾。即ち、まず等電点電気泳動 (isoelectric focusing: IEF) によりタンパク質の荷電状態 (等電点) をもとにした分離を行い、その後ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis: SDS-PAGE) によりタンパク質の分子量 (molecular weight: M.W.) をもとにした分離を行う。この手法は、等電点と分子量という二つの独立した因子により分離を行うため高い分離能を誇るが、実験操作が煩雑であり、また、分析に1日以上時間を要することから、一部の専門の技術者のみ

*¹ 技術本部 バイオセンシングシステム研究所 第2研究室

*² 技術本部 バイオセンシングシステム研究所 第1研究室

*³ 技術本部 新材料技術研究所 第3研究室

が使用するというのが現状であった。

本稿では、上記課題を解決するために二次元電気泳動の自動化システムおよび分離されたタンパク質を高感度に検出する方法を開発したので報告する。

1. 全自動二次元電気泳動システムの開発

1.1 タンパク質の二次元電気泳動の時間短縮

従来のタンパク質の二次元電気泳動では、一次元目のIEFを行うゲルとして、幅3mm、長さ200mm程度のpH勾配固定化ゲル（場所によってpHの値が異なるゲル）を用い、二次元目のSDS-PAGEを行うゲルとして、幅200mm、長さ200mm程度のアクリルアミドゲル（分子篩効果を有するゲル）を用いる。実験は、タンパク質サンプルを乾燥状態の一次元目ゲルに導入しゲルを膨潤させ（約8時間）、膨潤後のゲルに電圧を印加することで、タンパク質の等電点の差による分離（IEF）を行う（約8時間）。IEF終了後、一次元目ゲルをSDS、還元剤などからなる平衡化液中に移動し振とうすることで、タンパク質にSDS処理（タンパク質の高次構造を崩し、一様に負電荷を帯びさせる）を施す（約20分）。SDS化後、一次元目ゲルを二次元目ゲルの端面に移動し、電圧を印加することで、タンパク質の分子量の差による分離（SDS-PAGE）を行う（約2時間）。SDS-PAGE終了後、二次元目ゲルを染色液中に移動し振とうすることで、分離されたタンパク質の可視化（蛍光色素による標識）を行う（約2時間）。染色後、二次元目ゲルを洗浄液中に移動し振とうすることで過剰な色素を除去する（約2時間）。洗浄後、二次元目ゲルを蛍光スキャナで検出し、タンパク質の二次元電気泳動による分離結果を得ることで終了する。以上のように、従来の方法では、分析に1日以上時間を必要とした。

本開発では、一次元目ゲルおよび二次元目ゲルの小型化を行い、タンパク質の染色操作を一次元目の電気泳動終了後、化学標識により行うなど実験プロトコルの最適化を図ることで大幅な分析時間の短縮を実現した。一次元目のゲルとして、幅1mm、長さ52mmのゲルを開発し、二次元目のゲルとして幅48mm、長さ60mmのゲルを開発した。結果として、一次元目のゲルへのサンプル導入および膨潤を10分で、IEFを30分で、SDSによる平衡化とタンパク質の染色を20分で、SDS-PAGEを30分で行い、二次元電気泳動によるタンパク質の分析を1時間半に短縮した。

1.2 二次元電気泳動の自動化

従来の二次元電気泳動法では、手作業によるゲルの移動など煩雑な実験操作を必要とし、実験中の不純物

混入など結果の再現性が低いという課題があった。この問題点を解決するために二次元電気泳動の自動化システムの開発を行った。全自動二次元電気泳動を実現するためには、一次元目ゲルを順次異なる場所へ移動させる必要があることから、一次元目ゲルを安定な支持体に一体化し、可動ステージにより搬送可能な構成とした。自動二次元電気泳動システムの概念図を図1に、自動化システムに用いるために開発した支持体付一次元目ゲル（以下、1Dゲル）、一次元目の電気泳動および化学処理を行うためのチップ（以下、1Dチップ）、二次元目の電気泳動を行うためのチップ（以下、2Dチップ）を写真1に示す。

二次元電気泳動の自動化は、各溝に、タンパク質サンプル、ゲル膨潤液、染色液（蛍光色素）、洗浄液、平衡化液を予め充填した1Dチップ、およびSDS-PAGEを行うためのアクリルアミドゲル、電気泳動を行うための電解液を予め充填した2Dチップを冷却ステージ上に配置した後、支持体に一体化した1Dゲル

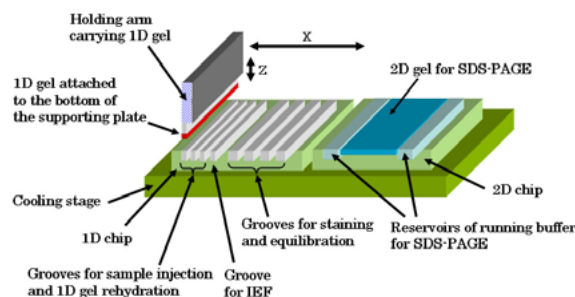


図1 自動二次元電気泳動システムの概念図

Fig. 1 Schematic diagram of automated two-dimensional electrophoresis system.

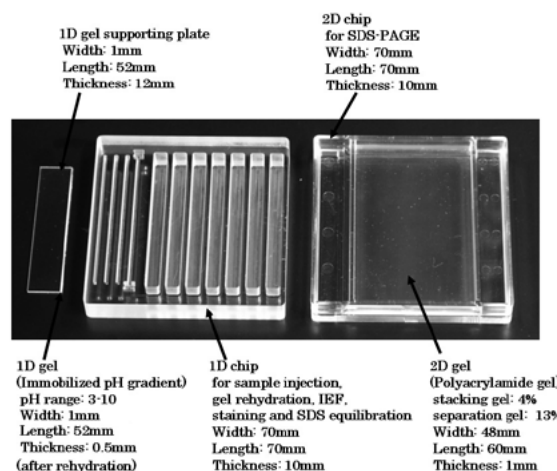


写真1 自動二次元電気泳動システムに用いるチップ類の写真

Photo 1 Photograph of chips using for automated two-dimensional electrophoresis.

をXおよびZ方向に可動なアームに固定し、冷却ステージ上に配置した1Dチップおよび2Dチップの所定位置に順次搬送し、二次元電気泳動の各工程の操作を実行することで実現した。

開発した全自動二次元電気泳動装置を**写真2**に示す。全自動二次元電気泳動装置は、可動アーム上への1Dゲルおよび電極類の吸着／脱着を制御するための吸着系、1Dゲルもしくは電極を吸着した可動アームをX軸方向およびZ軸方向の所定位置へ搬送する搬送系、IEFおよびSDS-PAGEを行うための所定電圧を印加する電圧印加系、電気泳動時の発熱を除去する目的で使用する冷却系の4系統から構成される。ユーザがサンプルを導入するだけで、自動で二次元電気泳動が完了するよう、LabVIEWプログラミング言語を用いて自動化プログラムをコンピュータ上に作成し、コンピュータ側から二次元電気泳動装置を制御することにより自動化を実現した。全自動二次元電気泳動装置の各系統および二次元電気泳動の自動化方法の説明を以下に行う。まず、1Dチップ上へ配置した1Dゲルおよび電極類を可動アーム（X軸およびZ軸方向に移動可能な搬送ステージに接続した部品）上へ自動で吸着／脱着させるため、真空ポンプ、電磁弁、駆動電力源、フォトカプラ、多機能データ集録ボード（デジタル出力使用）の組合せで吸着系の構築を行い、プログラム側からデジタル出力を通して電磁弁へ供給する電力のOn / Off制御を行うことにより、吸着系の自動化を実現した。可動アームを自動で所定位置まで搬送制御するため、X軸およびZ軸の2軸からなるステージをステッピングモータコントローラに接続することで搬送系の構築を行い、プログラム側からコントローラに駆動コマンドの送信を行うことにより、搬送系の自動化を実現した。溶液中に1Dゲルを浸した後、振とう動作が必要な場合は、Z軸を上下に繰り返し駆動させる



写真2 全自動二次元電気泳動装置の写真

Photo 2 Photograph of fully automated two-dimensional electrophoresis device.

ことで振とう動作を実現した。電気泳動に必要な電圧印加の制御は、IEFおよびSDS-PAGEに用いるモジュール電源、駆動電力源、多機能データ集録ボード（アナログ出力およびアナログ入力使用）の組合せで電圧印加系の構築を行った。プログラム側からアナログ出力を通して印加電圧値の設定を行うことにより、電気泳動に必要な所定電圧を出力し、アナログ入力を通して電気泳動時の電圧および電流モニタを行い、電圧印加系の自動化を実現した。電気泳動の再現性を向上させるため電気泳動時の温度を一定に保つことが重要であり、この目的で、ペルチェ素子、放熱フィン、空冷ファン、駆動電力源、熱電対、フォトカプラ、多機能データ集録ボード（デジタル出力およびアナログ入力使用）の組合せで冷却系の構築を行った。プログラム上で、熱電対からの信号をアナログ入力を通してモニタし温度に換算することで系の温度を把握し、温度設定値と温度モニタ値の関係からデジタル出力を通してペルチェ駆動をプログラム側でフィードバック制御することにより冷却系（温度制御）の自動化を実現した。また、プログラム上で、二次元電気泳動の工程管理（実行順序の管理）および時間管理（所定時間待機など）を行うことにより、全自動二次元電気泳動を実現した。

1・3 全自動二次元電気泳動システムを用いた結果

開発した全自動二次元電気泳動システムを用いて二次元電気泳動を行った。サンプルとして、マウス肝臓可溶性画分を用い、一次元目のゲルとしてpH3-10のpH勾配固定化ゲルを使用し、二次元目のゲルとして濃度13%のアクリルアミドゲルを使用した。電圧印加条件は、IEFが10分間で0Vから7000Vまで徐々に昇圧した後、20分間7000Vを維持の計30分間、SDS-PAGEが20mAの定電流で30分間行った。二次元電気泳動後の2Dゲルを蛍光スキャナで観察した結果（左図）、および位置再現性の結果（右図）を**図2**に示す。**図2**左図のゲル画像上の黒い斑点一つ一つが種類（等電点および分子量）の異なるタンパク質を表す。また、同様の実験を4回繰り返して行い、ゲル画像中の丸印に示したタンパク質の位置再現性を評価した結果が**図2**の右図である。本結果より、開発した全自動二次元電気泳動システムを用いて、タンパク質の二次元電気泳動が短時間かつ全自動で、高い再現性をもって実行されたことが判る。

2. 高感度検出システムの開発

タンパク質解析を診断に用いる場合、生体内に存在するタンパク質の濃度がタンパク質種によって大きく

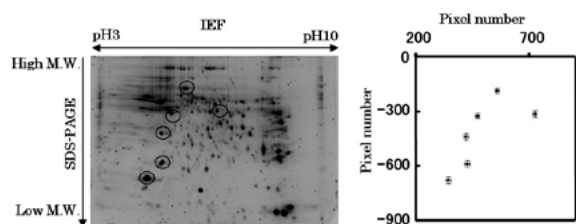


図2 自動二次元電気泳動結果と再現性評価

Fig. 2 Result of gel image after automated two-dimensional electrophoresis analysis and evaluation of reproducibility.

異なることに注意せねばならない。例えば、血液を例に取ると、血液中に含まれる心筋梗塞などの病気のバイオマーカーであるミオグロビンの濃度は 10^2 ng/mLと極微量であるのに対し、血液中に標準的に存在するアルブミンの濃度は 10^8 ng/mLと6桁以上のダイナミックレンジを有する。マウスの血清サンプルを二次元電気泳動により分離し、タンパク質を蛍光色素で染色した後、特定の波長を有する弱い照射強度 ($190\mu\text{W}/\text{cm}^2$) の励起光および強い照射強度 ($915\mu\text{W}/\text{cm}^2$) の励起光でゲル中の蛍光標識タンパク質を励起し、蛍光フィルタを装着したCCDカメラで両者の検出を行った結果を図3に示す。

弱い照射強度で励起を行った場合、高輝度(高濃度)のタンパク質スポットのみが検出され低輝度(低濃度)のタンパク質スポットは検出されず、強い照射強度で励起を行った場合、高輝度タンパク質からの光拡散が原因で低輝度タンパク質の検出が困難となった。アルブミンなどの高濃度タンパク質を生化学的な手法(抗体カラムなど)で除去することも可能であるが、全ての

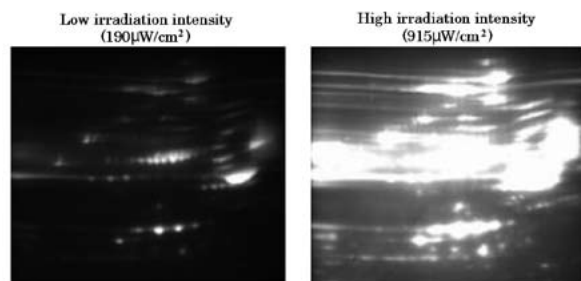


図3 従来方法を用いた二次元電気泳動後の血清サンプルの検出結果(左図:低照射強度,右図:強照射強度)

Fig. 3 Detection result of gel image after two-dimensional electrophoresis analysis of mouse serum by conventional detection method (Left image: low irradiation intensity, Right image: high irradiation intensity).

高濃度タンパク質を除去することは不可能であり、また、高濃度タンパク質も診断に用いる場合があるため、本開発では、高ダイナミックレンジに検出を行うシステムの開発を行った。

検出システムの高ダイナミックレンジ化を実現するため、図4に示すように、DMD (digital micromirror device)素子を利用し、強い照射強度で励起を行う場合は高輝度タンパク質が存在する位置には励起光を照射しない構成、即ち高輝度スポット領域をマスクしたパターンで励起光照射を行う構成とした。

パターン化された励起光を照射可能とするため、本開発ではDLP (digital light processing)方式のプロジェクタを励起光源として用いた。検出する蛍光色素の励起波長に対応するバンドパスフィルタを装着し

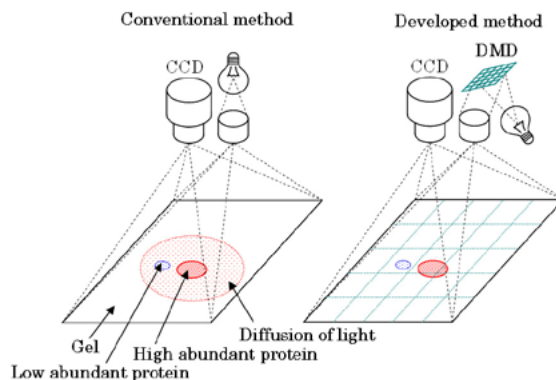


図4 従来の検出方法と開発した検出方法の比較

Fig. 4 Comparison between developed detection method and conventional one.

たプロジェクタ、蛍光波長に対応するバンドパスフィルタを装着したCCDカメラおよび両者を制御するコンピュータ、制御プログラムにより本開発の高ダイナミックレンジ検出系を構築した。制御プログラムではまずプロジェクタ側から基準パターンの画像を投影し、画素数の異なるプロジェクタとCCDのキャリブレーションを行う。キャリブレーション後、蛍光画像の取得をプログラムの制御により行う。まず、プロジェクタの弱い照射強度でゲル全面に励起光を照射し、CCDからの画像を取得する。次に、取得した画像中で、設定した閾値を越えた蛍光強度を有する画素データを記録し、その画素の出力をOffにしたパターン照射光を作成し、照射強度を前回画像取得時よりも強くして、ゲルにパターン化された励起光を照射する。再びCCDからの画像を取得し、照射強度がプロジェクタの最大照射強度に達したか否かの判定を行う。照射

強度が最大強度に達していない場合、上記の閾値判定、照射強度を上げパターン光照射、画像取得のループを繰り返し、照射強度が最大強度に達した場合は、取得したCCD各画素のデータを合成し最終画像を得る。

開発した検出システムを用い、**図3**に示したマウス血清サンプルを二次元電気泳動により分離し蛍光色素で染色したゲルに対して、上記プログラム制御により照射強度を $190\mu\text{W}/\text{cm}^2$ と $915\mu\text{W}/\text{cm}^2$ の2段階でパターン化励起光を照射し、CCD各画素のデータを合成した最終画像を**図5**に示す。**図3**に示すように、従来方法で問題であった、弱い照射強度時には低輝度のスポットが観察されない点と、強い照射強度時に高輝

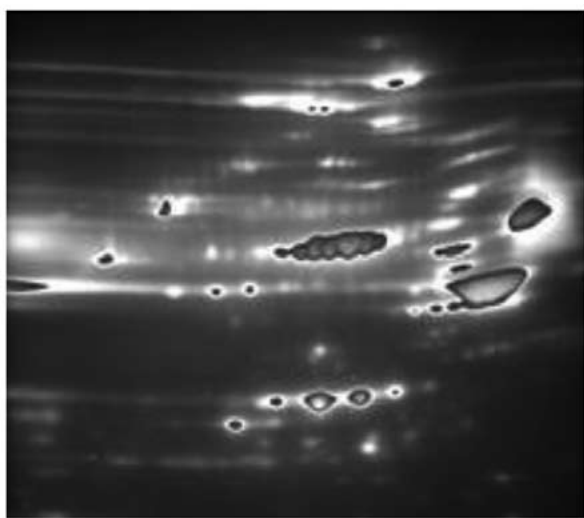


図5 本開発システムを用いた二次元電気泳動後の血清サンプルの検出結果

Fig. 5 Detection result of gel image after two-dimensional electrophoresis analysis of mouse serum by developed detection method.

度スポットからの光拡散が原因で低輝度スポットの観察が困難な点とを解決した画像が得られ、本開発の検出方法および検出システムの優位性が示された。

むすび

従来一部の研究者のみが使用可能で分析に長い時間を必要としたタンパク質の二次元電気泳動法を自動化・短時間化するシステムの開発に成功した。また、二次元電気泳動により分離したタンパク質を高いダイナミックレンジで検出するシステムの開発も行った。

バイオ分野の研究の進歩により、健康な人と癌などの病気を患う人とは、生体内タンパク質の等電点および分子量に変化が現れることが明らかとなってきている。今後は開発したシステムを用いデータベースを構築することで、個々人の健康状態の把握、病気の早期発見・診断への用途展開を図る。

謝辞

本開発は、独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構（NEDO）の健康維持・増進のためのバイオテクノロジー基盤研究プログラムに係る「バイオ・IT融合機器開発プロジェクト／DNAタンパク質等解析システム及びデバイス開発」の研究課題として行われたものである。同プロジェクトの共同研究者である、凸版印刷（株）、アステラス製薬（株）、東京工科大学、（独）産業技術総合研究所の関係各位に感謝致します。

参考文献

- 1) 岡田, 宮崎, “タンパク質実験ノート下巻～分離同定から一次構造の決定まで”, pp. 36 - 47, 羊土社 (2003).

(2006年6月13日受理)