

# 全自動二次元電気泳動・ブロッティング装置の開発

Fully Automated Two-Dimensional Gel Electrophoresis Blotting Device

緑川 宇一\* 松永 貴輝\* 木下 英樹\* 鷗沼 豊\*

Uichi Midorikawa Takateru Matsunaga Hideki Kinoshita Yutaka Unuma

タンパク質研究の網羅的解析において二次元電気泳動とウエスタンブロッティングは広く用いられている手法であるが、この作業は煩雑で熟練を要するため、タンパク質の転写効率や転写パターンの分解能などの再現性を得るのは容易ではなかった。そこで、このような課題を解決し、より短時間で再現性のあるデータを得るため、電気泳動分離から転写までの操作を全自動で行うことが可能なシステムを開発した。本稿では、高い転写効率と分解能で二次元電気泳動と転写を全自動で行う装置について報告する。

The two-dimensional gel electrophoresis and Western blotting are widely used in the comprehensive study of the proteins. However, these analyses usually suffer from poor reproducibility and efficiency in protein transfer because of their complicated experimental procedures. To solve these problems, a fully automatic operation system executing gel electrophoresis and blotting has been developed. It was successful to obtain highly producible results on the protein transfer with a high efficiency and a high resolution by using this system.

This system will be useful for the study of the proteins.

## 1. はじめに

近年、我々の体を構成しているタンパク質を大規模、網羅的に解析するプロテオーム研究が行われている。タンパク質は各種疾患や薬剤効果などに直接関係する生体分子であり、プロテオームとは細胞の中でDNAから作られたRNAによって生産されているタンパク質（プロテイン）の全体を意味する言葉である。このプロテオーム研究にはタンパク質のプロファイリングや機能解析などが挙げられる。一方、これまでにタンパク質や核酸などの試料を、その性質の違いにより分離して検出する様々な手法が開発され、その装置も開発されている。タンパク質の分離手法としては、電気泳動、限外ろ過、液体クロマトグラフィーなどがあるが、その分離能の高さからゲル電気泳動法が広く利用されている。特に二次元電気泳動は、一度に数千のタンパク質を分離し、網羅的に解析することが可能であるため、プロテオーム研究に有効であり、高感度で検出が可能なウエスタンブロッティング法（タンパク質を膜に固定させ、抗原抗体反応によって特定のタンパク質を検出する手法）と共に広く利用されている。

従来、電気泳動法とウエスタンブロッティング法はそれぞれ独立した装置で研究者が手作業で行っていた。一般的には、電気泳動装置にてタンパク質の分離を行った後、

分離されたタンパク質を含むゲルを装置から取り出し、転写（ブロッティング）装置にセットして、ゲル内のタンパク質を膜に転写する。この操作は非常に柔軟性の高いゲルを扱う為、煩雑で熟練を要する作業であり、分解能や再現性に課題があった。そこで、電気泳動からウエスタンブロッティングまでの一連の操作を自動化する技術を開発した。本稿ではこの開発内容について解説する。

電気泳動で用いるタンパク質や免疫反応で用いる抗体等、プロテオーム解析に用いるサンプルは、一般に手間をかけて細胞や組織から分離、抽出してきた場合が多い。そのため、電気泳動からウエスタンブロッティングまでの一連の操作においても、サンプルのタンパク質をより容易に、より無駄なく、より効率的に転写させるための技術が求められており、本開発技術はこのようなニーズに応えるものである。

## 2. 二次元電気泳動とウエスタンブロッティングの技術

### 2.1 二次元電気泳動法

二次元電気泳動は一次元目の等電点電気泳動 (isoelectric focusing: IEF) と二次元目の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) によってサンプル中に含まれるタンパク

\* 新規事業推進本部 健康医療事業推進センター

質をゲル内で二次元に分離する方法である。IEFではタンパク質の荷電状態（等電点）をもとに分離が行われ、SDS-PAGEでは、タンパク質の分子量（molecular weight: M.W.）をもとに分離が行われる。当社はこの二次元電気泳動を自動化した装置「Auto 2D」を開発し、シャープマニファクチャリングシステム株式会社より2011年秋から販売を開始している<sup>1)</sup>。

## 2.2 ウェスタンブロッティング法

電気泳動により分離したタンパク質を検出する手法として、ウェスタンブロッティング法と呼ばれる方法がある。図1のように、ウェスタンブロッティング法にはタンパク質の転写と抗体による免疫反応の2つの工程がある。転写の工程では、電気泳動で分離したゲル内に存在するタンパク質を、タンパク質結合能力を有するニトロセルロース膜またはPVDF (Polyvinylidene difluoride) 膜などの多孔質膜に吸着させて固定化する。免疫反応の工程では、膜に転写された特定タンパク質を抗原として、1次抗体と呼ばれる特異抗体を反応させ、さらに蛍光色素などが標識された2次抗体を反応させる。このように抗原抗体反応に基づいて、転写膜上の特定タンパク質を蛍光スキャナー等によって検出する手法がウェスタンブロッティング法である。

ウェスタンブロッティング法と前述した二次元電気泳動との組み合わせは、特定のタンパク質の発現やリン酸化等の翻訳後修飾を分析することが可能であるので、プ

ロテオーム解析において有効な方法となっている。

## 3. 本装置の技術開発と性能評価

### 3.1 転写自動化技術

前述したように、電気泳動によって分離されたタンパク質は膜への転写、免疫反応を経て検出されるが、一般に電気泳動装置と、転写装置とは、それぞれ独立した装置として存在しており、研究者が電気泳動後、転写を行う際には、電気泳動装置からゲルを取り出し、転写装置へゲルと転写膜をセットするという作業を行う。装置間の移動を伴うこのような作業は、作業者の熟練を要するため、タンパク質の転写効率や転写パターンの分解能などの再現性を得るのは容易ではない。現状、このような課題は検出後のパターンマッチング等の画像処理ソフトでサポートされているが、必ずしも十分とは言えない。

我々はこのような課題をシステム全体から解決し、より短時間で再現性のあるデータを得るため、図2のような電気泳動分離からウェスタンブロッティングまでの操作を全自動で行うことが可能な装置を開発した。本装置の概念図を図3に示す。装置は3つのチップ（IEFチップ、溶液チップ、2DE・転写チップ）と搬送アームから構成される。溶液チップにSDS平衡化液、ゲル膨潤液、サンプルを入れ、PAGEゲル、押圧部材、転写膜、緩衝液を配置した2DE・転写チップと固定化pH勾配 (Immobilized pH Gradient: IPG) ゲルを保持したIEFチップを装置にセットすれば、サンプル導入とIPGゲルの膨潤後、一次元目の等電点電気泳動を行い、SDSの平衡化処理を経て、二次元目のSDS-PAGE、さらに転写膜への転写の全ての工程を自動で連続的に行うことが可能である。SDS-PAGEまでは「Auto 2D」の技術を利用したものである

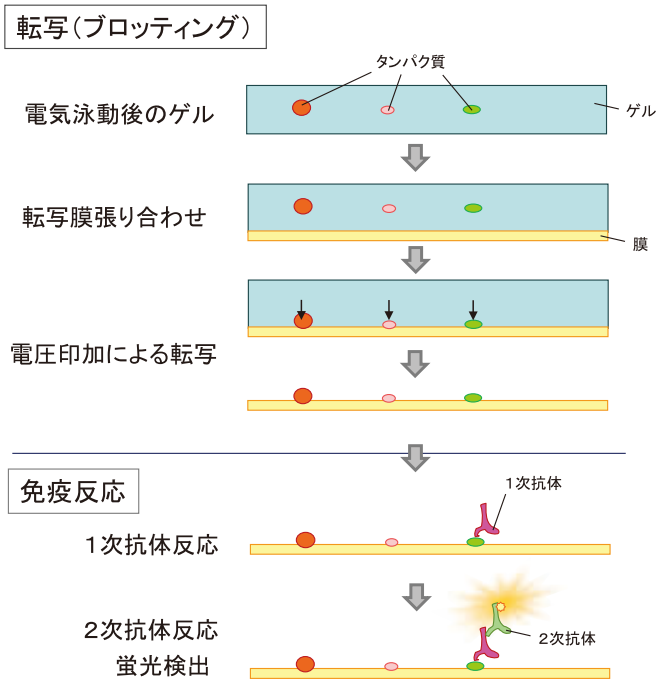


図1 転写 (ブロッティング) と免疫反応  
Fig. 1 Blotting and fluorescent antibody reaction



図2 全自動電気泳動・ブロッティング試作装置  
Fig. 2 Prototype of fully automated tow-dimensional gel electrophoresis blotting device

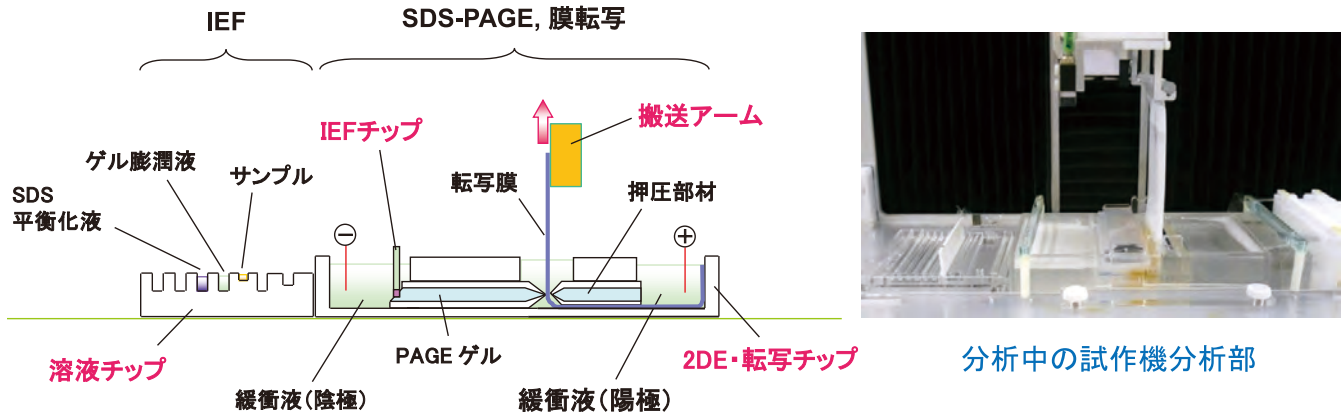
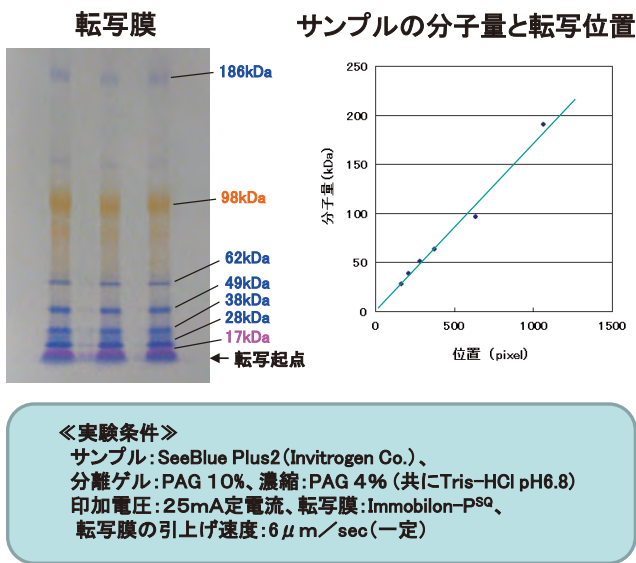


図3 全自動二次元電気泳動・プロットング装置の概念図  
Fig. 3 Schematic diagram of fully automated tow-dimensional gel electrophoresis blotting device



《実験条件》  
 サンプル: SeeBlue Plus2 (Invitrogen Co.)、  
 分離ゲル: PAG 10%、濃縮: PAG 4% (共にTris-HCl pH6.8)  
 印加電圧: 25mA定電流、転写膜: Immobilon-PSQ、  
 転写膜の引上げ速度: 6 μm/sec (一定)

図4 全自動SDS-PAGE・転写の結果  
Fig. 4 Result of fully automated SDS-PAGE blotting

が、本装置では、SDS-PAGEで分離されたタンパク質をPAGEゲルの端面から排出させ、そのままPVDF膜に吸着させる。ゲル端面とPVDF膜が接する部分を小さくし、最適な圧力で圧着させることで高分解能を実現した。本装置では、ゲルは装置に固定されたまま、転写までの工程が終了するので、手作業によるゲルの歪みによって転写パターンが乱れることはない。完全に自動化したことで再現性の高い結果が期待できる。

市販されている染色済分子量マーカー (SeeBlue Plus2, Invitrogen Co.) を用いてSDS-PAGEから転写までを本装置で行った結果を図4に示す。分離ゲルは10%、濃縮ゲルは4%とし、PAGEゲル、緩衝溶液、PVDF膜を予め装置にセットし、25mAの定電流でSDS-PAGEを行い、6 μm/secでPVDF膜を移動させながら、連続的にプロットングを行った。図4のに示す転写膜のように、本

装置では、乱れのない精細な分子量マーカーのバンドパターンを得ることができた。

### 3.2 転写効率の評価

従来のプロットング装置を用いた操作では、タンパク質の転写効率が1つの重要な課題であった。転写効率が低いとサンプル量が多くても検出が困難となる。タンパク質を転写膜に高効率で固定させるには、緩衝溶液の組成や電圧の印加条件などを最適化する必要があった。条件が合わないと、ゲルからタンパク質を取り出せなかったり、タンパク質が転写膜を通過して抜けてしまったりする。また、これらの条件は個々のタンパク質の特性によってことなるため、実験者の経験に基づく判断による場所が多かった。

本装置では、ゲルからタンパク質を全て排出させ、転写膜を移動させながら吸着させるので、高い転写効率が期待できる。サンプルとして分子量29kDaのCarbonic Anhydraseを用いて本装置の転写効率を検討した結果を図5左に示す。サンプル量を10, 20, 40, 80ngとし、本

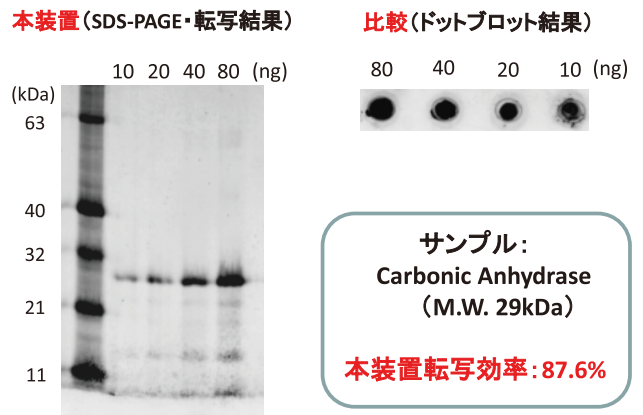


図5 全自動SDS-PAGE・転写の結果  
Fig. 5 Evaluation of blotting efficiency

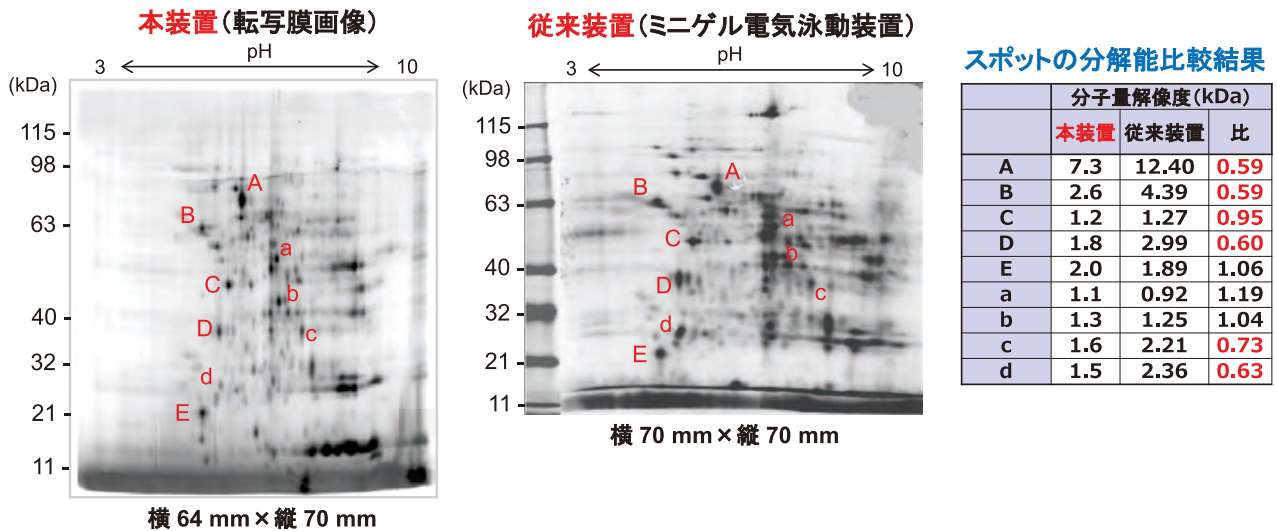


図6 転写結果と分解能評価  
Fig. 6 Result of 2DE blotting and evaluation of resolution.

装置でSDS-PAGEから転写までを行った。比較基準として、ドットプロット法で同様のサンプルを転写膜にプロットした結果を図5右に示す。ドットプロット法では直接サンプルを膜に滴下するので、吸着効率は100%と見なせる。検出された蛍光強度から本装置によるCarbonic Anhydraseの転写効率を算出した結果、転写効率87.6%で転写が行われることが判った。

### 3.3 分解能の評価

本装置にて、生体サンプルを用いて、二次元電気泳動からプロットングまでを行った結果を図6に示す。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10%のポリアクリルアミドゲルを使用した。マウス肝臓可溶性画分に含まれるタンパク質は予め蛍光標識しておき、二次元電気泳動・転写後の転写膜(PVDF膜)を蛍光スキャナーで観察した。転写膜画像の黒いスポット一つ一つが検出された種類(等電点および分子量)の異なるタンパク質である。従来装置(一般的なミニゲル電気泳動装置とプロットング装置)と比較すると、本装置による画像ではより鮮明なスポットが確認できた。

本装置のユニークな特徴として、転写膜の引き上げ速度を自由に設定することができるという点が挙げられる。引き上げ速度を変えることで、分子量方向の分解能を向上させることが可能である。図6の結果から任意スポットのAからE、およびaからdを選択し、その分解能を算出した結果を図6右の表に示す。転写膜の引き上げ速度を工夫することで、AからD、およびcとdのスポットで

は従来装置よりも高解像度で分子量方向の分離を行うことに成功した。このような従来には無かった機構を組み込んだ自動化装置を開発したことで、高性能を実現することができた。

## 4. むすび

本技術は、これまで3日から4日を要していた二次元電気泳動から転写までの工程を3時間以内に完了することができ、現在のプロテオーム研究の加速化を実現するものである。応用として、製薬会社や大学、診断・検査機関等でのタンパク質解析への利用を期待している。本装置の二次元電気泳動・プロットングを短時間、高効率・高分解能で再現性良く行う技術によって、個人の健康状態の把握や疾患の早期発見など、予防医学の発展にも貢献したい。

本開発は、科学技術振興機構(JST)の研究開発事業先端計測分析技術・機器開発プログラムにて、熊本大学との共同研究の下で開発したものである。また、本開発の基礎技術は、新エネルギー・産業技術総合開発機構(NEDO)の助成事業(平成15年度-20年度)での研究によるものであり、独立行政法人産業技術総合研究所、熊本大学、東京工科大学、凸版印刷株式会社との共同研究の成果である。

### 参考文献

- 1) 丸尾祐二, タンパク質分析装置の開発, シャープ技報, 2011年12月, 第103号, 4-8