

## 簡易電気泳動と活性染色を用いた「酵素の働き」に関する実験の教材化

Enzyme activity staining after separation using agarose gel electrophoresis, and its application to school teaching

林 真・柴田 公彦\*・山崎 正弘\*\*・川上 欣洋\*・徳永 健太\*

福島工業高等専門学校 モノづくり教育研究支援センター

\* 福島工業高等専門学校 物質工学科

\*\*福島工業高等専門学校 専攻科 物質・環境システム工学専攻

Makoto Hayashi, Kimihiko Shibata\*, Masahiro Yamazaki\*\*,  
Yoshihiro Kawakami\*, Kenta Tokunaga\*

Manufacturing Support Center for Education and Research, Fukushima National College of Technology

\*Department of Chemistry and Biochemistry, Fukushima National College of Technology

\*\*Advanced Course in Chemical and Environmental System Engineering, Fukushima National College of Technology

(2011年9月15日受理)

The gel electrophoresis is a very important method of analysis in the research of molecular biology and biochemistry, and the method to separate and to analyze the protein is being executed in the student experiment of this college now. Therefore, the experience of the technique seems to be meaningful for junior high school students.

However, it is difficult to include such experiments in the school experience and public lecture for junior high school student because of safety concerns, the expensive materials and experimental equipment and time consumed.

This report introduces an electrophoresis using horizontal agar gels for the detection of enzyme activity. Activity of the enzyme was rapidly and easily visualized on the gels. The total time required for the experiments is less than 1 hour. The experiments proposed here are the convenient teaching materials to acquire molecular biological knowledge and techniques.

**Key words:** agarose gel electrophoresis, enzyme activity staining, application to school teaching

### 1. はじめに

電気泳動法は、生物試料に含まれる個々のタンパク質やDNAを、電場中を移動させながら分離して可視化、分析するための強力な手段であり、分子生物学・生化学分野の研究ではなくてはならないものとなっている。電気泳動の一般的な支持体はポリアクリルアミドゲルやアガロースゲルであり、前者はDNA断片、後者はタンパク質やDNAの分離に使用されることが多い。本校物質工学科3年生および4年生の学生実験においても、現在ポリアクリルアミドゲル電気泳動法によりタンパク質、アガロースゲル電気泳動によりDNA断片を分離・分析する実験を実施している。したがって、中学生を対象とした体験入学や実験講座等の機会に、この電気泳動を用いた実験を行うことは、本校の実習内容の一部を中学生に認知させることになる

ともに、より若く柔軟な頭脳を持つ時期にバイオ技術を理解させることになり、大きな意義があると考えられる。しかし、ゲルの材料としてポリアクリルアミドを用いた場合、コストや有害性、実施時間の問題等が生じる。そこで、今回は中学生を対象とした実験を想定し、より安価で安全性の高い簡便な実験方法を検討した。

### 2. 実験方法

#### 2.1 試料・試薬および装置

試料としてダイコンおよびカイワレダイコンをいわき市内のスーパー等で購入した。玄米は伊達市の農家から提供を受けた。試薬は、特に記載がない限り試薬特級を用いた。

泳動装置には電源が一体化しており低価格な超小型電気泳動システムMupid(株式会社アドバンス)を用いた。

## 2.2 ゲルの調製

アガロースまたは寒天 (Agar) を秤量し、最終ゲル濃度が 1.6 % となるよう泳動用緩衝液 (25 mmol dm<sup>-3</sup> トリス-グリシン緩衝液、pH 8.6) を加え、電子レンジで加熱し溶解させた。これを型 (ゲルメーカー) に流し込み、固まるまで放置した。泳動条件の検討のために、ゲル濃度を 1.0~4.0 % とした寒天ゲルを同様の方法で作成した。

## 2.3 電気泳動

泳動槽に 25 mmol dm<sup>-3</sup> トリス-グリシン緩衝液 (pH 8.6) を約 300 mL 入れ、同緩衝液で作製したアガロースゲルまたは寒天ゲルをセットした。次にマイクロピペッターを用いて試料溶液 20 μL をウェルに注入し 100 V で 25-35 分間電気泳動した。

## 3. 結果と考察

### 3.1 アガロースと寒天の比較

Mupid を用いた電気泳動では支持体としてアガロースゲルを用いるため、神経毒性を有するアクリルアミドから作製されるポリアクリルアミドゲルと比較して、ゲル作製の簡便さと安全性の向上を図ることができる。そのため今回はタンパク質の電気泳動を Mupid を用いて行った。その時、「アガロース」を、微生物培養の寒天培地の作製に用いられる安価な「寒天 (Agar)」で代用できるかどうかを検討した。

ダイコンのおろし汁を試料として、アガロースゲルおよび寒天ゲルを用いた電気泳動を行い、その後、タンパク質に特異的に結合する色素クーマシーブリアントブルーでタンパク質の検出を行った結果を図 1 に示す。寒天ゲルで行った場合はアガロースゲルの場合と比較しゲル全体が薄く染色された。

寒天の中にはアガロース以外の成分が含まれており、その影響で寒天ゲルに物質が吸着しやすいことは古くから知られており<sup>1)</sup>、現在では電気泳動に寒天ゲルが使われることはなく、寒天から精製されたアガロースで作成したゲルが専ら使用されている。しかし本研究におい

ては、寒天ゲルの使用が観察に大きな支障をきたすほどではなかったことから、経済性を重視して、アガロース (約 400 円/g) よりも安価な寒天 (約 40 円/g) を使用することにした。

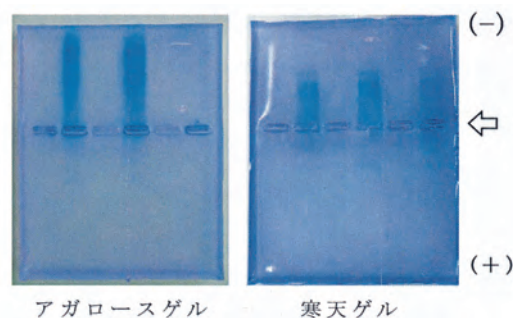


図 1 アガロースと寒天の比較  
ゲル中の寒天濃度：両方とも 1.6 %  
泳動時間：25 分間  
(← は試料の注入位置を示す)

### 3.2 電気泳動条件の検討

3.1 に示した通り、支持体として安価な寒天を用いることが可能であることがわかったことから、適切な寒天濃度および泳動時間について検討を行った。

1.0~4.0 % の範囲で寒天濃度を変えて作成したゲルを用いて電気泳動を行ったところ、寒天濃度が低いほどタンパク質の泳動速度が速く、それにより泳動時間を短縮できることが確認できた。しかし寒天濃度が低いほど、ゲルが柔らかいため操作の途中で崩れてしまう恐れがあることも分かった。実験操作に不慣れた中学生が扱うことを考慮し、ある程度の硬さを有するゲルとするため寒天濃度は 1.6 % が適切と判断した。また、1.6 % の寒天ゲルを用いたときの泳動時間を検討したところ、最短で 20 分間で泳動可能であることが分かった。

### 3.3 実験例の開発

アイデア次第で、タンパク質の寒天ゲル電気泳動法を用いた様々な実験が可能である。本法がタンパク質の高次構造を保持したまま泳動できる方法であることを生かし、今回は「酵素の働き」に関する 2 つの実験例を開発した。

(1) 活性染色を用いたペルオキシダーゼの部位特異的発現の検出

本校物質工学科 4 年生の基礎生物学実験の 1 つのテーマとして、オリジナル実験であるカイワレダイコンを用いたタンパク質の部位特異的発現解析を実施している<sup>2)</sup>。この実験では、「多細胞生物を構成する細胞は一部のものを除き同じ遺伝情報のゲノムを持つが、タンパク質の発現はその細胞の担当している機能によって異なる」ことを確認するとともに、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動をタンパク質の分子量測定や同定に利用できることを学んでいる。今回はこの内容を、中学生に概念的に理解してもらえるような簡便な実験にアレンジした。また基礎生物学実験の他のテーマにおいて、過酸化水素、ペルオキシダーゼの存在で鋭敏に青緑色に発色する試薬 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMBZ) を用い、ダイコンのペルオキシダーゼ活性を検出する実験も行っている。TMBZ は、従来この目的に用いられていた *o*-ジアニシジンなどより発ガン性がなく比較的安全的な試薬であることから、今回はこのペルオキシダーゼ検出法も組み合わせた実験例を開発した。



図 2 カイワレダイコンの各部位

カイワレダイコンを図 2 のように根、茎、および葉の部位に分け、それぞれ乳鉢ですりつぶし、そのホモジネートをマイクロチューブに移し、遠心上清を試料として用いた。

寒天ゲルに試料 20  $\mu$ L を注入し、電気泳動を 25 分間行った。泳動後ゲルを活性染色用緩衝液 (100 mmol dm<sup>-3</sup> アジピン酸緩衝液、pH 5.0) 20 mL、3 % 過酸化水素水 1 mL、0.1 % TMBZ を含む 50 % エタノール水溶液 1 mL の混合溶液に室温で浸漬し、適当な染色像が得られるまで活性染色を行った。

結果を図 3 に示した。主に 3 カ所 (図 3 A-C) の位置で、TMBZ の呈色が見られた。これは「同一の生体内で同じ反応を触媒する異なる酵素 (アイソザイム)」がカイワレダイコンに少なくとも 3 種類存在することを示しており、このようなペルオキシダーゼ・アイソザイムの存在は他の植物においても報告されている<sup>3)</sup>。今回の場合、A のタンパク質は試料の注入位置から + 極側に移動していることから、使用した緩衝液条件でこのタンパク質が負に荷電していたことが分かり、一方、- 極側に移動した B と C のタンパク質は正に帯電していたことが分かる。このような結果を教材に、アイソザイムの存在やタンパク質が両性電解質であること、タンパク質ごとに性質が異なることなどの教示が可能である。

呈色の見られたそれぞれの位置について、呈色の濃さを比較すると、A では根 < 茎 < 葉の順であるが、B では逆に根が最も濃く、また C においては根でのみ呈色が見られた。このように各ペルオキシダーゼの存在量が部位により異なることが示されたことから、これによりタンパク質の部位特異的発現の教示も可能である。

基礎生物学実験では、電気泳動前にタンパク質の定量を行い、ウェルに添加するタンパク質量を合わせ、分子量マーカーとともに電気泳動することで分子量などの解析を行っている。今回はこれらの操作を省略したためそのような精密な解析はできないが、中学生を対象に簡便かつ安全な実験操作でタンパク質の部位特異的発現を概念的に理解させることができるものと考えられる。

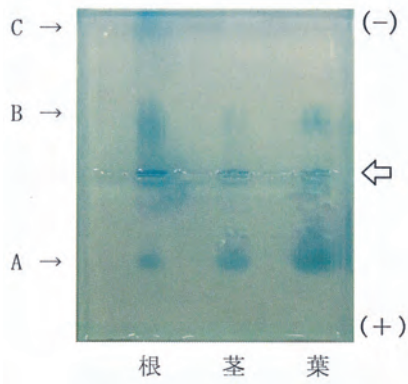


図3 ペルオキシダーゼの部位特異的発現  
 ゲル中の寒天濃度：1.6 %  
 泳動時間：25 分間  
 ( ← は試料の注入位置を示す)

(2) 活性染色を用いたアミラーゼの成長段階特異的発現の検出

アミラーゼは消化酵素として中学生にも馴染みのある酵素である。その基質となるデンプンは、中学生がすでに学習しているヨウ素デンプン反応により容易に検出可能である。イネ科の植物には高いアミラーゼ活性が含まれることが良く知られていることから、今回はイネを材料に、ヨウ素デンプン反応を利用した活性染色を組み合わせた実験例を開発した。

最初に、常温で保存した玄米を、水を含ませたスポンジ中に播き、図4に示すように一定期間経過する毎に採取した(未播種、播種1日後、播種3日後、播種6日後)。それぞれの胚乳1粒に泳動用緩衝液(25 mmol dm<sup>-3</sup> トリス-グリシン緩衝液、pH 8.6) 200 μLを加え、乳鉢で粉碎後、その遠心上清を試料として用いた。

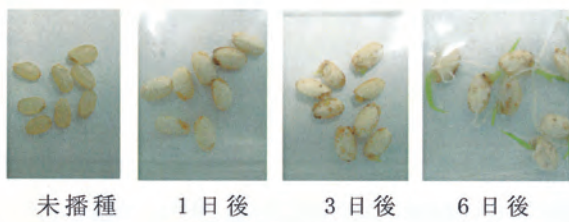


図4 採取した種子および播種後の経過日数

本実験例ではアミラーゼの基質となるデンプンを含む寒天ゲルを作成した。泳動用緩衝液(25 mmol dm<sup>-3</sup> トリス-グリシン緩衝液、pH 8.6)に、寒天とデンプンをそれぞれ濃度 1.6 %、0.25 % となるように加え、電子レンジで加熱し溶解させた。これを型に流し込み、固まるまで放置した。

試料 20 μL をデンプンを含む寒天ゲルのウェルに注入し電気泳動を 30 分間行った。その時、標準品として 0.5 % アミラーゼ溶液も同時に電気泳動した。泳動後のゲルを市販のポピドンヨードを 5 倍希釈した溶液に室温で浸漬し、適当な染色像が得られるまで活性染色を行った。

結果を図5に示した。寒天ゲルにデンプンを添加したため、ヨウ素デンプン反応によってゲル全体が呈色したが、試料の注入位置に近い位置で呈色を示さないスポットが観察できた。このスポットが、デンプンが分解された位置、すなわちアミラーゼが存在する位置を示す。今回の検討において、アミラーゼの標準品は注入位置から-極側に移動し、イネ試料においても同様の位置にスポットが見られた。未播種のものにはアミラーゼ活性を示さず、播種後の日数経過に伴いアミラーゼが増加することが示された。

また播種6日後の試料においては、塗布位置から+極側の位置にもスポットが見られるようになった。イネ科植物におけるアミラーゼ・アイソザイムの存在が知られており<sup>4)</sup>、今回の結果もそれを示しているものと考えられる。

以上のように、市販のポピドンヨードうがい薬を用い、中学生にも馴染みのあるヨウ素デンプン反応によるアミラーゼ活性染色を実施することができた。この実験も非常に簡単な操作のみで構成されるが、得られる結果は成長段階によりタンパク質の発現が異なることを直観的に理解させる上で十分なものと考えられる。

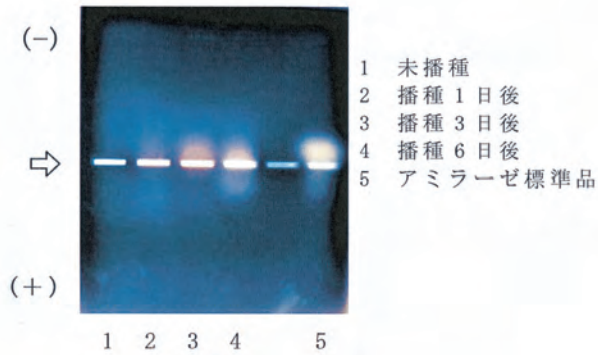


図 5 イネの成長段階に応じたアミラーゼ発現

ゲル中の寒天濃度：1.6 %

泳動時間：30 分間

( ⇨ は試料の注入位置を示す)

#### 4. 実験講座の実施例

図 6 は福島県いわき市の中学生の本校での職場体験学習の際に開催した実験講座の様子である。実験例 1 に示した「活性染色を用いたペルオキシダーゼの部位特異的発現の検出」のテーマで実施した。この講座の実施にあたっては、専門的な用語の使用を可能な限り控え、遺伝情報発現、タンパク質合成、酵素の特性等を、順を追って説明し電気泳動から活性染色に至る流れおよび原理を理解できるよう配慮した。受講者の実験操作に関して特に問題はなく、実験の原理を理解できていたものと思われる。講座の所要時間も約 1 時間であった。このような中学生向けの講座で重要なことは、自然科学に興味を持たせ、苦手意識を生じさせないことであるので、実験教材の開発だけでなく、時間配分、解りやすく解説する技術等、全体的な講座の進め方を工夫する必要性を感じた。



図 6 中学生に対する実験指導

#### 5. おわりに

ゲル電気泳動法は現在の分子生物学・生化学分野のバイオ研究における重要なツールであるが、今回の検討により中学生を対象とした実験講座等でも実施可能な簡便、迅速、安価な教材とすることができた。今回示した実験例は、中学生の酵素についての理解を図る上で良好なものとなり得る。本法が、若く柔軟な頭脳を持つ中学生のバイオ技術に対する正しい知識・技術の習得の一助となることを期待する。

#### 参考文献

- 1) Hjerten S., Agarose as an anticonvection agent in zone electrophoresis, *Biochim. Biophys. acta*, 53, 514-517 (1961)
- 2) 天野仁司：「福島高専物質工学科生物コースの学生実験 - オリジナル実験 (蛋白質の部位特異的発現解析) の紹介 -」、平成 21 年度 化学教育研究協議会東北大会 講演予稿集 (2009)
- 3) YONEDA Y., PEROXIDASE ISOZYMES IN FOUR STRAINS OF MORNING GLORY, *Japan. J. Genetics*, 45(3), 183-188 (1970)
- 4) 小野 一、永吉照人、望月 明：「コムギ胚乳におけるアミラーゼアイソザイム」、兵庫農科大学・神戸大学農学部研究報告 (1968)