

第24回麻布環境科学研究会 講演B8

迅速化マイクロ2次元電気泳動法による メダカ血漿およびビテロジェニンの分析

田澤 英克, 坂口 和子, 鈴木 潤

麻布大院・環境保健学・病態生化学

1. 目的

マイクロポリアクリルアミドゲル2次元電気泳動法¹⁾(M2D-PAGE)は2次元電気泳動法のゲルサイズをマイクロ化したもので、試料を多数同時に泳動可能ななどの利点を持っている。われわれはこれまでに、M2D-PAGEの更なる付加価値を追求し、既存の装置と同等に扱える程度の操作性でゲル厚とゲル径の縮小化を行い、より高電圧を負荷して泳動時間短縮、精度向上、および少試料化を目指してM2D-PAGEの迅速化を行った。その結果、M2D-PAGEでは泳動時間が1次元目80分、2次元目60分で、脱染色を含めた1サイクルが4時間以上であったところを、泳動時間はそれぞれ1分、4分と短縮、1サイクルを30分以内に終了し、加えて、要する試料は1/12の量で、半定量も可能であることを報告^{2),3)}した。

今回はこの分析法を用いて微量試料であるメダカ血漿の分析に応用することを試み、タンパク質スポット(以下スポット)の半定量と環境ホルモンのマーカータンパクであるビテロジェニン(VTG)の免疫学的染色法(WB法)による同定が可能になったので報告する。

2. 方法

メダカの採血は光学顕微鏡下で、p-アミノ安息香酸エチルで麻酔を施したメダカを開胸し、心臓から採血を行ったが、通常の注射器では採血できないので、ヘパリン処理をした歯科麻酔用の33Gの注射針を用いた自作採血用吸引器具を用いて採血を行い、血液をヘパリン処理済みのヘマトクリット毛細管に

採った。血液は10,000 rpmで5分間遠心分離後、血漿をマイクロシリンジで採取し、プロテアーゼインヒビターとして0.1 mM PMSFを添加して使用直前まで-80℃で保存した。

迅速化M2D-PAGEにおいて、1次元目等電点電気泳動の泳動条件は定電圧250 Vで4分、500 Vで4分、さらに1,000 Vで4分の計12分とした。2次元目密度勾配ポリアクリルアミド電気泳動の泳動条件は平板ゲル1枚当たり定電流15 mAで7分とした。

泳動後のゲルはクマシーブリリアントブルー(CBB) R-250で染色、脱色した後、スキャナーでパソコンに撮りこみ2次元画像解析ソフト(Phoretix社2D-Full)を用いて画像を解析し、積算光学濃度(IOD)を算出した。VTGのWB法による同定では、泳動終了後、平板ゲルをPVDFメンブレンに転写し、抗メダカVTG抗体を用いて、HRP標識2次抗体とDAB基質による化学発色で検出した。

3. 結果および考察

1次元目等電点電気泳動の泳動条件を2,500 Vで1分とした報告³⁾では、スポットによっては、テーリングを引き起こし、領域によってはスポットが重なり合ってしまう、半定量の際に正確な値を得ることが困難となった。そこで、前述のようにステップワイズ方式で電圧を負荷させ泳動を行ったところ、スポットのテーリングの改善が確認できたのでこの泳動条件を用いた。

メダカ血漿0.2 μLからはCBB染色では平均40個のスポットが得られた。主要スポットに関しての個

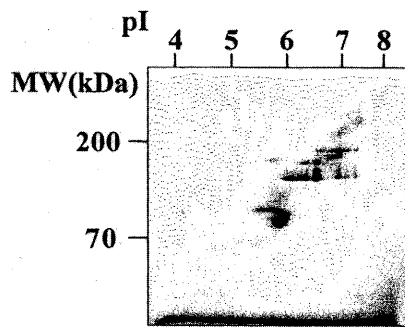


図1 メダカ（雌）血漿のM2D-PAGE像

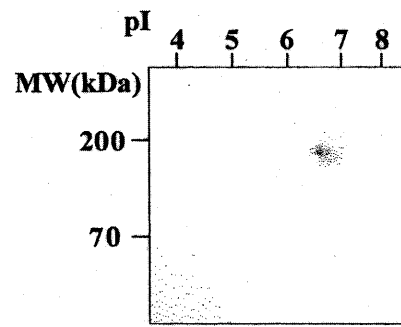


図2 メダカ（雌）VTGのWB法による同定

体差は少なく、また、雌では雄と比較してpI5.5～8.5、MW150～300 kDaの領域に特徴的なスポットが多いという性差が観察された。さらに、2次元画像解析ソフトを用いて主要スポットの半定量を行った結果では、検量線の相関係数はそれぞれ高い値を示した。

VTGのWB法による同定では、雌血漿から、pIマーカー、分子量マーカーを同時に泳動して、次に転写すると、メンブレン上でpH6.5～7.5付近、MW約180 kDaの領域にVTGスポットが確認された。

1匹のメダカから取れた血漿の量は平均0.5 μ Lと少量なので、2次元電気泳動による分析結果の報告は皆無であり、VTGに関しては、SDS-PAGEにより変性状態でのMWが報告されているだけで、その他の性状は不明のままであった。また、SDS-PAGEやELISAでのVTG検出を目的とした実験の報告では、試料量の問題から肝臓組織を用いるか、あるいは複

数の血漿をプールして実験をおこなう場合がほとんどであった。しかし、本法では1匹のメダカから得られた0.2 μ Lの微量試料でも平均40個のスポットが得られ、半定量することが可能であり、また、血漿からのWB法によるVTGの同定は0.05 μ Lで可能であり、これらの成績よりVTGの未変性条件下でのpIとMWが判明した。単一個体からのデータが得られることにより、スポットの半定量化などの処理を加えると、個体レベルでの環境ホルモン等の影響評価が期待できる。これらのことから、本法の微量試料分析における有用性が示された。

文献

- 1) Manabe T, et al., *Electrophoresis*, 1985; 6: 462-467.
- 2) 田澤英克, 他. *生物物理化学*, 2004; 48(4): 175-179.
- 3) 田澤英克, 他. *生物物理化学*, 2003; 47補: 21.