

イネの発芽段階におけるたんぱく質の違い

～SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動によるタンパク質分析方法の習得と、
細胞の文化を分子レベルで確認する試み～

二年理数科 伊賀・中村・財部
中村・大庭・長尾・神谷

主題設定

昨年の先輩方が行った「見抜け、食品偽装」というタイトルの、さまざまな魚の刺身からDNAを抽出して増幅、そして電気泳動を行って分析を行った課題研究の実験を参考にさせていただきました。DNAの実験は福岡工業大学の施設や実験機材を使わせてもらったので、今回は学校で自分たちにも分析できる物質がないかを検討し、タンパク質で研究を進めていこうと決めました。

目的

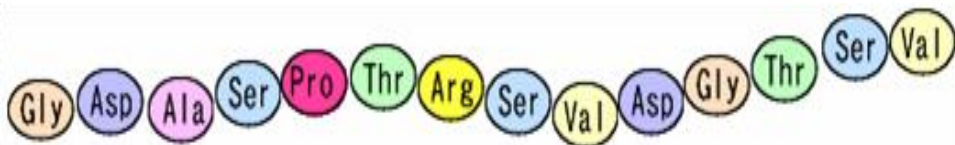
- ・SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動を使用するタンパク質分析方法を習得する
- ・細胞の分化を分子レベルで確認する

仮説

1. 様々な食品に含まれているタンパク質はそれぞれ異なる
2. 胚には多くのタンパク質が含まれている
3. イネではそれぞれの品種で含まれているタンパク質が異なる
4. 肺から抽出したタンパク質と芽や根に分化した細胞のタンパク質とは異なる

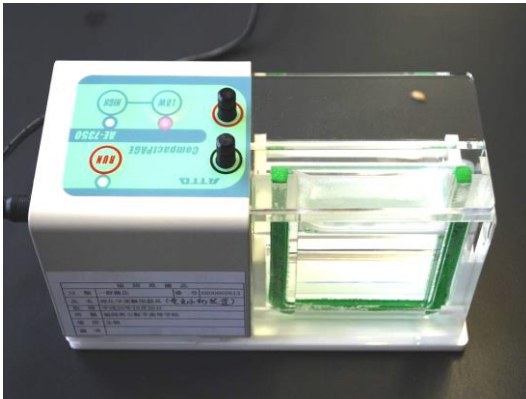
実験

タンパク質は、アミノ酸が多数結合してできたポリペプチド鎖からなる高分子化合物であり、複雑で特有な立体構造を持っている。この立体構造でタンパク質の機能が決まる。

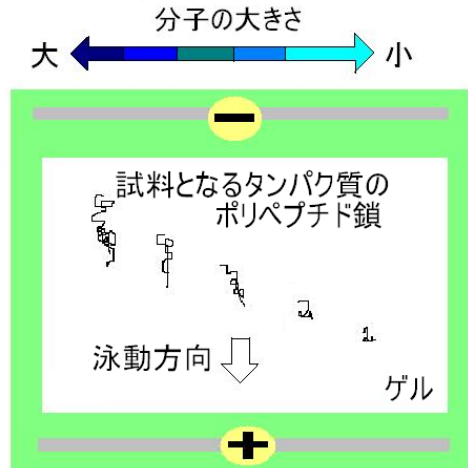


タンパク質の1次構造 (ポリペプチド鎖)

SDS-PAGE (SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動)は、ゲルの中にタンパク質と通過させ、分子量の違いによってタンパク質を分離するものです。まずタンパク質をあらかじめ処理しておき、紐状の分子にしておきます。そして界面活性剤で分子を負に荷電させることで、分子を上から下の方向に流します。この際、小さな分子ほどゲルの中を泳動しやすくなっています。(下・右図)



実験に使用したスラブ型電気泳動槽



1. 溶液調整

・A 溶液

アクリルアミド 29.2g

メチレンビスアクリルアミド 0.8g

以上を蒸留水に溶解し 100mL にメスアップ

・B 溶液

トリス 18.2g

SDS 0.4g

以上を蒸留水に溶解し、塩酸で pH8.8 に調整し、100mL にメスアップ

・C 溶液

トリス 6.1g

SDS 0.4g

以上を蒸留水に溶解し、塩酸で pH6.8 に調整し、100mL にメスアップ

・D 溶液

過硫酸アンモニウム 100mg

以上を蒸留水 1.0mL に溶解

・SDS 泳動バッファー

トリス	1.5g
グリシン	7.2g
SDS	0.5g

以上を蒸留水に溶解し 500mL にメスアップ

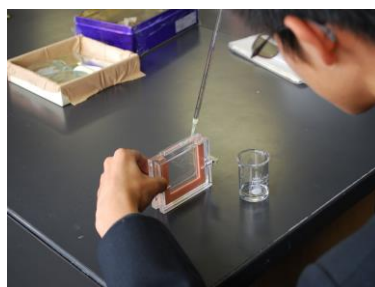
・ サンプル処理液

C 溶液	1.0mL
SDS	0.1g
2-メルカプトエタノール	0.1mL
グリセリン	2.0mL
1%BPB 溶液	10 μ L

以上を蒸留水に溶解し 10mL にメスアップ

2.泳動用ゲルの作製

分離ゲル溶液		濃縮ゲル溶液	
純水	2.25mL	純水	1.80mL
A 溶液	4.50mL	A 溶液	0.45mL
B 溶液	2.25mL	C 溶液	0.75mL
D 溶液	30.0 μ L	D 溶液	10.0 μ L
TEMED	5.00 μ L	TEMED	5.00 μ L



ガラス棒で丁寧に混合し、作製する。 ※D 溶液と TEMED は最後に加え穏やかに混合する。

- (1)ゲル作製機器を組み立てる
- (2)分離ゲル溶液を 1000 μ L スケールのマイクロピペットを用いて
ガラスプレート間にゆっくりと流し込み、純粋 100 μ L をその上に重層する
※分離ゲル溶液を流しこんだ場所と同じ位置から流し込むとスムーズに入る
- (3)30～40 分放置すると重合が完了する
※分離ゲルと純粋の境界が明瞭に見えるようになり、分離ゲルの上端が数 mm 下がる
- (4)重層した蒸留水を捨て、濃縮ゲル溶液を調整する
- (5)濃縮ゲル少量を分離ゲルの上に注ぎ、ゲル上端を洗浄して捨てる
- (6)濃縮ゲル溶液をプレート上端まで入れる(約 400 μ L)
- (7)気泡をつけずにサンプルコウムとガラスプレート間に差し込み約 30 分静置する

3. 泳動の準備

- (1)ゲルをゆっくりと引っ張り、ゲルプレートを丁寧に取り出す
- (2)コウムを上方にゆっくりと抜き取り、ゲルプレートを泳動槽の手前に設置
※ゲルプレートを傾斜させてゲル底部の気泡が入らないようにする
- (3)ホルダーを回転させてガラスプレートを泳動槽に固定する
- (4)ゲルプレート上端から2~3mm 下が緩衝液面になるように泳動バッファーを入れる(約 55mL)
※気泡がある場合はシリンジの針などで気泡を動かし取り除く
※ゲルがまっすぐに立っていない場合はシリンジの針でゲルの側面を押し直立させる
- (5)ピペットで2~6 μ L を目安に処理した泳動用試料を添加する

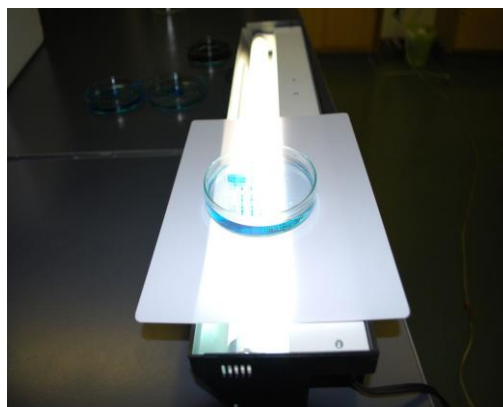
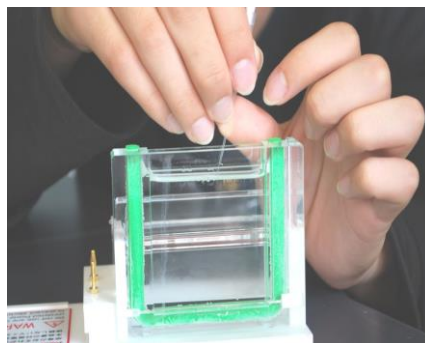
4. 泳動

(1) タンパク質の抽出

乳鉢で試料をすりつぶしてサンプル処理液で溶かす
熱処理を行うため、水から沸騰させる中で湯煎する
遠心分離を行い、上澄みのみをサンプル液とする

(2) 電気泳動

- 1.ゲルに試料を注入(左図)
- 2.泳動槽にセットし約1時間流す
- 3.ゲルを固定・染色する(下左図)
- 4.脱色で余分な染色剤をとる
- 5.蛍光灯の上で観察(下右図)

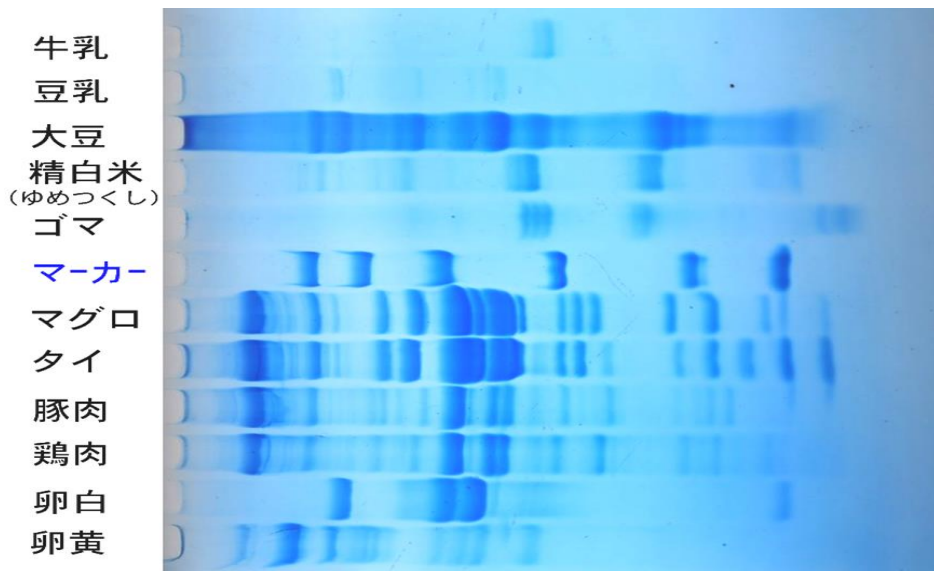


結果

仮説 1. 様々な食品に含まれているタンパク質はそれぞれ異なる

⇒身近なものでタンパク質を含む食材である、

牛乳、豆乳、大豆、コメ、ゴマ、マグロ、タイ、豚肉、鶏肉、卵白、卵黄からタンパク質を抽出し SDS-PAGE にかけてみました。

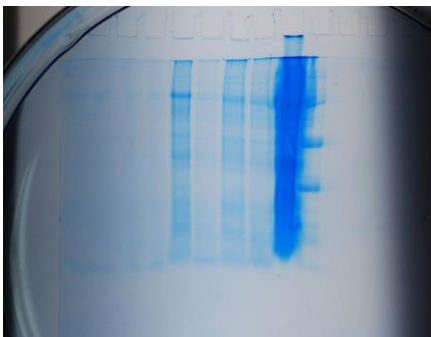


ご覧のように、それぞれの食材で異なるタンパク質のバンドが観察されました。

一般的に、動物にタンパク質が多く含まれています。また、マグロとタイ、豚肉と鶏肉では似たようなパターンが確認できます。一方、同じ鶏でも鶏肉と卵白、卵黄で大きく異なることも分かります。

このように、生物の種類の違いをタンパク質の違いとして SDS-PAGE で確認できることがわかりました。

仮説 2. 胚には多くのタンパク質が含まれている



胚に多くのタンパク質があると考え、胚からタンパク質を抽出しコメと同質量だけつぶして泳動しました。

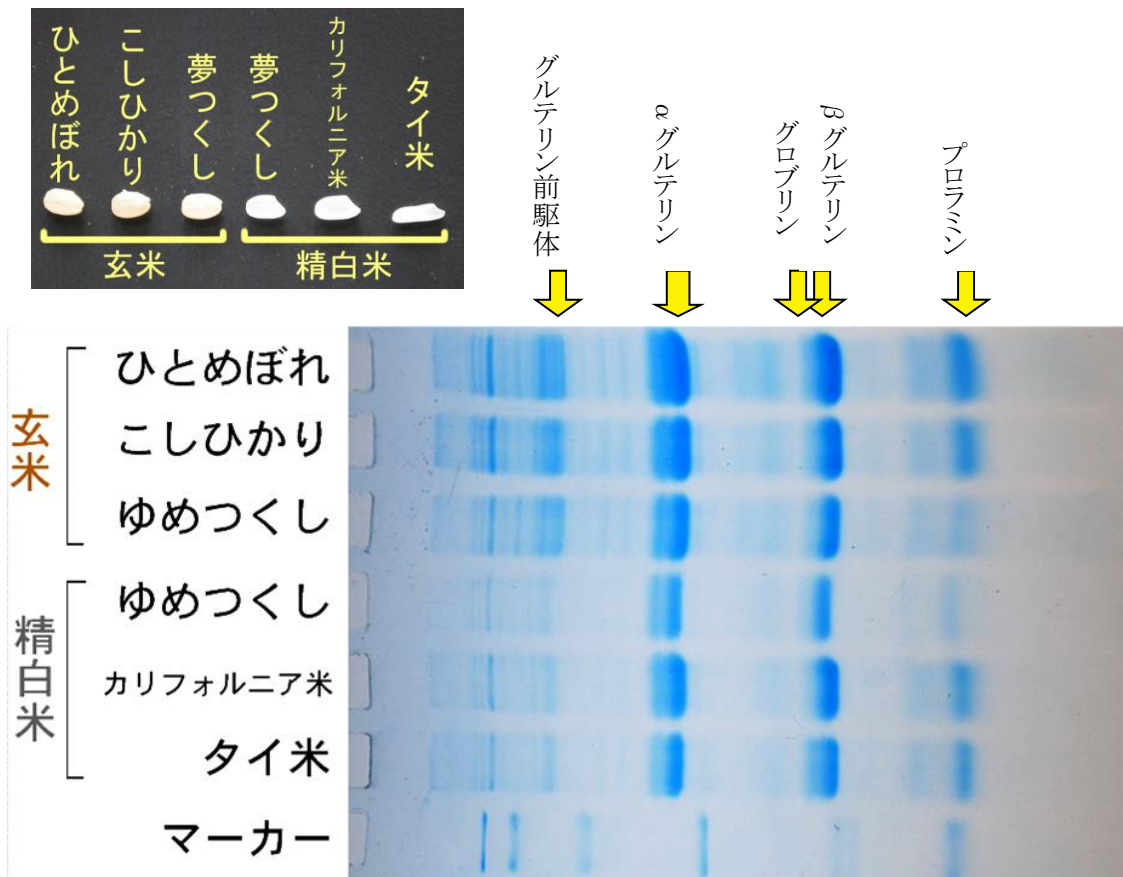
予想以上にタンパク質が多く、ブロードしてしまいました

⇒胚に含まれるタンパク質が多いことがわかりました。

仮説 3. イネではそれぞれの品種で含まれているタンパク質が異なる

⇒福岡のお米「ゆめつくし」に加え、「こしひかり」「ひとめぼれ」の玄米、
「カリフォルニア米」と「タイ米」を購入しました。

これらのコメ、一粒ずつからタンパク質を抽出し、SDS-PAGE を行いました。



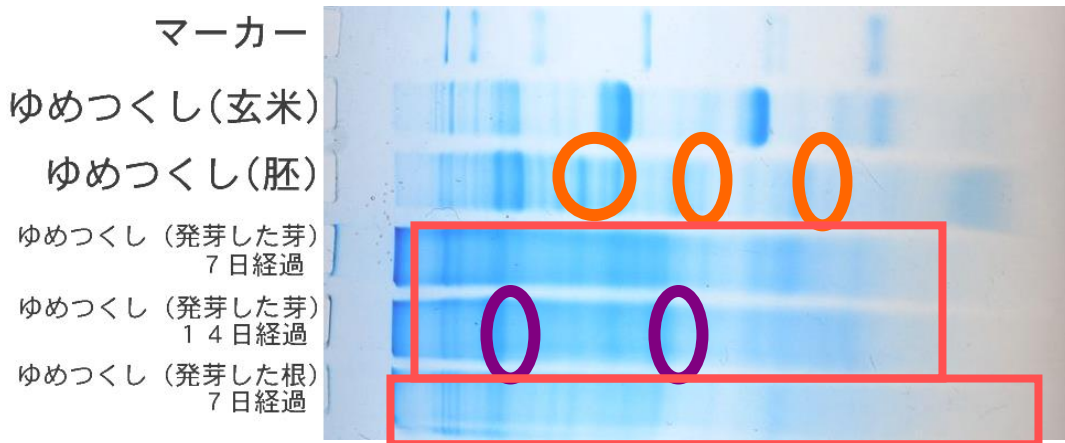
大変期待していたものの、結果は予想に反して変わり映えしませんでした。

イネは品種が違っていても基本的なタンパク質の種類や大きさには違いがないと確認されました。品種による味の違いなどは、タンパク質の違いではなく、デンプンなどの炭水化物やアミノ酸などの違いなのではないかという考えに至りました。

しかし、この実験の中で唯一はっきりとした違いを見せていたのが、ゆめつくしの玄米と精白米でした。玄米に含まれるタンパク質のいくつかは、精白米では確認が出来ません。このことより、玄米から削られる胚の部分に、これらのタンパク質があると推測しました。

仮説4. 肺から抽出したタンパク質と芽や根に分化した細胞のタンパク質とは異なる

20粒の玄米から胚を削りだしてタンパク質を抽出し、さらに、種もみを発芽させ、7日目と14日目の芽と根からタンパク質を抽出して SDS-PAGE を行いました。



玄米に比べ胚にはたくさんの種類のタンパク質が確認されました。やはり、発芽に必要なタンパク質がたくさん作られていると分かります。次に発芽した芽について確認します。7日目、14日目それぞれのレーンの背景が青くなっていますが、これは遺伝子が活性化され様々な物質がたくさん作られているためだと考えています。

タンパク質のバンドを比較すると、胚に含まれるタンパク質のうち見られなくなるものが多いことが分かります。これは、合成されるタンパク質の種類が減っているからだと考えられます。逆に芽に分化することで合成されるタンパク質もいくつかあります。さらに、14日目の芽では2つのタンパク質の合成が盛んになっていることも分かります。一方、根では芽ほど多くのタンパク質が確認されませんでした。

考察・まとめ

- ①食材に含まれるタンパク質は、それぞれ特徴はあるものの、違いもはっきりしている。
- ②イネの品種の違いによる米に含まれるタンパク質に大きな差はない。
- ③胚に含まれるタンパク質は種類も量も多いが、発芽によって細胞の分化が進むと、それぞれの細胞で特定のタンパク質が合成される。

以上のことより、細胞が分化すると特定のタンパク質が合成されるようになり、それ以外のものは作られなくなると考えられます。すなわち、分化が進み特定の遺伝子だけがはたらくと考えると、細胞の分化をタンパク質という分子レベルで確認することも可能ではないでしょうか。

感想

研究内容を決めたり、実験の方針を進めたりする中で、一人一人の考えを尊重しつつ取り組んでいくのはとても苦労しましたが、実験が成功したときの喜びや達成感はそれを勝るものでした。(伊賀)
ゲル作製など授業では体験できないことができ、人の手ではなく自分達で最後まで研究に取り組むことができた充実した課題研究だったと思います。(財部)

12回の電気泳動の実験の中で、いろいろな失敗を繰り返しましたが、回数を重ねるごとに手際が良くなり、自分たちで工夫できるまでになりよかったです。(中村)

難しくて分からなかったことも多かったけれど、ゲル作製の合間にみんなでわからないところを教え合ったり意見を交換出来て非常に有意義な研究でした。(大庭)

一回の電気泳動につき8時間もの時間がかかりとても苦労しましたが、結果を見たときの感動はとても大きなものでした。(中村)

研究を進めるにあたり実験に関する書籍やホームページを見たことは、研究に役立ったことはもちろん、今までは知らなかった知識を増やすことにも繋がりが嬉しく思います。(長尾)

研究を始めてから普段何気なく食べている食物のタンパク質に注目するようになり、興味関心が増したことを日常生活の中でも実感することができました。(神谷)

今回の課題研究をするにあたって協力していただいた有吉先生、斉木先生をはじめとする先生方やお米を提供して下さった農家の方々のおかげでこの研究が有意義なものになったと思います。本当にありがとうございました。