

ニセアカシア (*Robinia pseudoacacia* L.) のカルス分析用 SDS ゲル電気泳動法の検討

陳, 任
九州大学農学部林学第三講座

玉泉, 幸一郎
九州大学農学部林学第三講座

齋藤, 明
九州大学農学部林学第三講座

<https://doi.org/10.15017/23614>

出版情報 : 九州大学農学部学藝雑誌. 52 (3/4), pp.177-182, 1998-03. Faculty of Agriculture, Kyushu University

バージョン :

権利関係 :

ニセアカシア (*Robinia pseudoacacia* L.) の カルス分析用 SDS ゲル電気泳動法の検討

陳 任・玉 泉 幸一郎・齋 藤 明

九州大学農学部林学第三講座

(1997年11月28日受付, 1997年12月3日受理)

Study on SDS Polyacrylamide Gel Electrophoresis for the Analysis of *Robinia pseudoacacia* L. Callus

Ren CHEN, Koichiro GYOKUSEN and Akira SAITO

Third Course of Forestry Department, Faculty of Agriculture,
Kyushu University, Fukuoka 812-8581

緒 言

SDS (sodium dodecyl sulfate) は $-SO_4^-$ を親水基として、また、 $CH_3(CH_2)_{11}$ を疎水基としてもつ陰イオン性の界面活性剤である。1967年に、Shapiroらは、2-メルカプトエタノールによる還元によって試料蛋白質のS-S結合を切断しておき、その蛋白質をSDSの存在下でポリアクリルアミドゲル電気泳動で、蛋白質を構成するポリペプチド鎖の分子量に対応して分離出来る手法を開発した(Shapiro, 1967)。その後、1970年には、Laemmliはこの実験手法を改良し、分離ゲルの上に分離ゲルよりpHの低い濃縮ゲルを重ねて不連続緩衝液 SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動法を確立した(Laemmli, 1970)。この方法は極めて簡便で、不可溶性蛋白質を含む全ての蛋白質の分離・分析の手段としてばかりでなく、蛋白質の分子量を推定するための手段としても効果的に利用出来、広く用いられるようになってきた。植物の分野では、特に種子、葉等各種組織を材料として、多くの研究に用いられている。

ところが、カルス、胚様体等を材料として分析する場合には、上述の組織を材料とする分析では認められない異常に出会うことが多い。異常を生じる主な原因は、供試材料自身の蛋白質の含有量が低く、或は細胞内には糖蛋白質、酸性蛋白質、塩基性に富んだ蛋白質、低分子量の蛋白質(10KD以下)及びフェノール性物質等が多く含まれているため、これらの物質の介在でSDS-ポリペプチドの結合に著しい影響を与え、電気

泳動による蛋白質の分離が悪く、バンドが歪み、背地の色が濃い等の異常を示す場合が多い(堀尾, 1981; Matheka, 1977; Mayer, 1987; Swaney, 1974)。これらの問題を解決するために、いくつかの変法が報告されている(Buchley, 1994; Mayer, 1987; Mhatre, 1991; Roberts, 1989; Sotak, 1991)が、供試分析材料の違いによってそれぞれ異なった結果が得られている。

そこで本研究では、様々な方法を試みた上で、ニセアカシア(*Robinia pseudoacacia* L.)の胚軸から誘導した様々なカルスを分析するための試料の調製方法、ゲルの作製方法、電気泳動の方法等種々の検討を行い、最適な方法を確立したので報告する。

材料及び方法

1. 供試材料

無菌条件下で培養した15日目のニセアカシアの稚苗1本の下胚軸を外植体として誘導したカルスを電気泳動の材料とした。カルスの誘導には、MS (Murashige and Skoog, 1962)培地に2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) $1\mu\text{M}$ とBAP (6-benzylaminopurine) $10\mu\text{M}$ を加え、蔗糖2%、ゲルライト0.24%を添加した固形培地を用いた。

2. 試料液の調製

試料抽出液の種類と組成をTable 1に、試料緩衝液の組成をTable 2に及び試料の調製方法をTable 3に示した。

試料の調製は4種類の試料抽出液、1種類の試料緩

衝液、加熱の有無、8Mと4Mの尿素を組み合わせる全部で16処理とした。先ず、誘導したカルスを0.5gずつ16個を切り取って、それぞれ乳鉢に入れ、該当の試料抽出液を62.5 μ l加え、水の上で研磨した。これ

らの試料をそれぞれ1.5mlのチューブに入れ、遠心機で4 $^{\circ}$ C、10000 μ 分、15分の遠心分離を行った。

次に、各チューブから上清液を取り、これに250 μ lあたりに75 μ lの試料緩衝液を加え、加熱処理(沸騰水中で3分)と非加熱処理に分けて行った。加熱処理した試料液を室温に戻した後、全ての試料液に粉末の尿素を240mg或は120mg(最終濃度8M或は4M)添加して室温で振盪器で50回/分、5時間程度で十分に混合した後、泳動用の試料液とした。

3. 濃度勾配分離ゲルの作製

Table 4に示したように、アクリルアミド濃度が7.5

Table 1. Component of various sample extraction solution.

Component	S1	S2	S3
Tris-HCl (pH6.8) (mg)	606	1212	2424
Triton X-100 (ml)	2		
EDTA (mg)	37	15	
EGTA (mg)	38		
DTT (mg)	1540		46.25
Ascorbic acid (mg)	88		
Leupeptin (mg)	1		
Sucrose (mg)		12000	
MgCl ₂ (mg)		40.65	
Protamin sulfate (mg)	17		
NaCl (mg)	1750		
Distilled water (ml)	98	100	100
Total (ml)	100	100	100

Table 2. Component of sample buffer solution.

Tris-HCl (pH 6.8) (g)	5.05
SDS (g)	13.33
2-Mercaptoethanol (ml)	33.33
Distilled water (ml)	66.67
Total (ml)	100

Table 3. Methods of sample preparation.

No. of sample	11	12	13	14	21	22	23	24	31	32	33	34	41	42	43	44
Callus (g)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Sample extraction solution (μ l)	S0 (distilled water)				S1	S1	S1	S1	S2	S2	S2	S2	S3	S3	S3	S3
Extraction	The samples were ground in mortar and were centrifuged at 10000 rpm/min for 15min.															
Supernatant (μ l)	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250
Sample buffer (μ l)	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75
Heat-treatment	*	*			*	*			*	*			*	*		
Urea (mg)	240	120	240	120	240	120	240	120	240	120	240	120	240	120	240	120
Preparation	The samples were incubated at room temperature shaking at 50 rpm/min for 5 hrs.															
Total (μ l)	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500

*The sample was heated in boiling water for 3 min.

Table 4. Component of various gradient (7.5-15%) separating gel.

Number of separating gel	G1		G2	
	7.5%	15%	7.5%	15%
30% Acrylamide, 0.8% BIS (ml)	10	30	10	30
1.5M Tris-HCl (pH 8.8), 0.4% SDS (ml)	15	15	15	15
Distilled water (ml)	34.7	14.7	34.4	14.4
10% Ammonium persulfate (μ l)	150	150	300	300
10% TEMED (μ l)	150	150	300	300
Total (ml)	60	60	60	60

%から15%まで直線的に増加する SDS を含む濃度勾配分離ゲルを作製した。過硫酸アンモニウム、TEMED (N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine) の最終濃度は0.025%と0.050%の2種類とした。

ゲルの作製手順としては、アクリルアミドの濃度を7.5% (淡溶液) と15% (濃溶液) に分けて作製した。まず保存液 [30% Acrylamide, 0.8% BIS (N,N'-methylene-bisacrylamide) と1.5M Tris (hydroxymethyl aminomethane)-HCl, 0.4% SDS] から適当の量を取り出して、それぞれ A, B のビーカーに入れ、蒸留水を添加してから静かに攪拌して、脱気装置で15分脱気した。そして、これらの溶液を8℃下で1時間冷却した後、それぞれ濃度勾配作製装置のピンチコックの A, B の筒に移して、攪拌しながら、過硫酸アンモニウム及び TEMED を添加してペリスタチックポンプによってゲル作製槽 (日本エイドー NA1611型) のガラス板 (6組, 130mm×138mm) の間に注入した。注入の速度は8mm/分とした。ゲルをガラス板に注入する前に、予め100%のエタノール (濡れ剤) を20ml ゲル作製槽に入れた。分離ゲルを作製した後、室温で約5時間重合させた。

4. 濃縮ゲルの作製

濃縮ゲル用重合液の組成を Table 5 に示した。重合液を静かに混合して分離ゲルの上に重層し、試料コームを挿入した。室温で約3時間重合させた後、ゲルをビニールでラップして、使用まで8℃に保存した。

5. 電気泳動

電気泳動直前に試料コームを抜き、試料溝に残っていた未重合のアクリルアミドを除き、ガラス板を電気泳動槽に取り付け、上部電極液と下部電極液の何れにも泳動用緩衝液 (Table 6) を満たして、各試料液 (16種類) を20 μ l ずつ試料溝に注入した。0.5ml の0.1% BPB (bromophenol blue, 電気泳動標記マーカー) 液を上部電極液に添加して、通電を行った。

電気泳動は室温で行い、電圧はBPBのバンドが分離ゲルに入るまで (約1.5時間) 80V とし、BPBのバンドが分離ゲルに入ってから下端に接近するまで (約6時間) 120V, 150V 或は120V-150V-180V (120V で2.5時間, 150V で2.5時間, 180V で1時間) の3種類とした。

6. 染色と脱色

電気泳動終了後、ゲルをガラス板から取り出し、染色液 (Table 7) に浸入して振盪器で振盪 (50回/分) しながら約5時間染色し、脱色液 (Table 8) で同じ方法で脱色した。その後、泳動パターンを写真を撮つ

Table 5. Component of starting gel.

30% Acrylamide, 0.8% BIS	(ml)	3
0.25M Tris-HCl (pH 6.8), 0.2% SDS	(ml)	15
Distilled water	(ml)	11.2
10% Ammonium persulfate	(μ l)	350
10% TEMED	(μ l)	500
Total	(ml)	30

Table 6. Component of electrode buffer solution.

Glycine	(g)	7.21
Tris	(g)	1.51
SDS	(g)	0.50
Distilled water	(ml)	500
Total	(ml)	500

Table 7. Component of staining solution.

Coomasie brilliant blue R-250	(mg)	750
Methanol	(ml)	250
Acetic acid	(ml)	35
Distilled water	(ml)	215
Total	(ml)	500

Table 8. Component of destaining solution.

Methanol	(ml)	125
Acetic acid	(ml)	50
Distilled water	(ml)	325
Total	(ml)	500

た後、乾燥させて保存した。

結果と考察

1. 試料の調製方法の影響

電気泳動の結果を Fig. 1 に示した。試料抽出液を添加した試料と添加しなかった試料の泳動結果を比べて、添加しなかった試料 (S0) の方がゲル下部の1本のバンドを失う (或いは薄くなる) ことが観察された。これは試料に混在するプロテアーゼ (蛋白質分解酵素) によって試料の蛋白質が分解された或いは変性や修飾された可能性が高い。一般的に、試料内に含んでいるプロテアーゼは SDS の存在下でも活性を保っている場合が多く、また、酸性条件下で不活性されたプロテアーゼの中にも pH を上げれば生き返る場合もある。プロテアーゼの存在で、試料蛋白質が分解され、

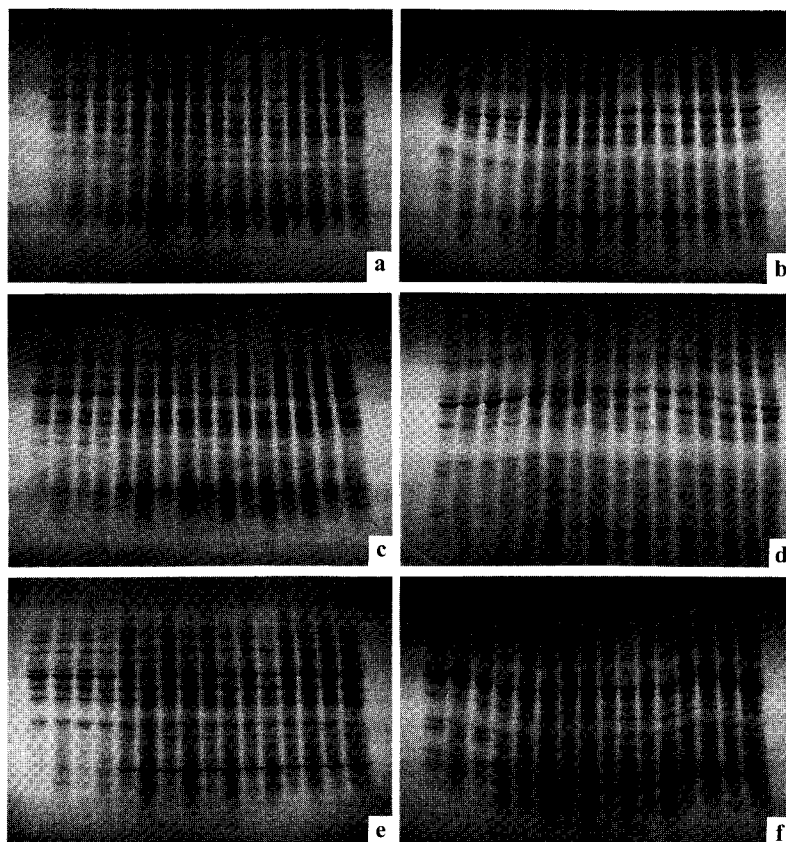


Fig. 1. Comparison of the results of SDS polyacrylamide gel electrophoresis obtained from different methods of sample preparation, chemical components of gradient separating gel and conditions of electrophoresis.

a, b, c, d, e, f: The sample solutions numbered 11, 12, 13, 14, 21, 22, 23, 24, 31, 32, 33, 34, 41, 42, 43, 44 (table 3) were loaded to each lane from left to right of each gel.

a, c, e: The gradient separating gel were polymerized chemically by the addition of 0.025% of TEMED (tetramethylethylenediamine) and ammonium peroxodisulfate.

b, d, f: The gradient separating gel were polymerized chemically by the addition of 0.050% of TEMED and ammonium peroxodisulfate.

a, b: Electrophoresis were carried out with electric voltage of 80V for the stacking gel and 120V for the separating gel.

c, d: Electrophoresis were carried out with electric voltage of 80V for the stacking gel and 150V for the separating gel.

e, f: Electrophoresis were carried out with electric voltage of 80V for the stacking gel and 120V for 2.5 hrs., 150V for 2.5 hrs., 180V for 1 hr. for the separating gel.

電気泳動のバンドはなくなることが認められると言う(池原, 1974)。試料抽出液に DTT (dithiothreitol), EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid), EGTA (ethyleneglycol- β -aminoethylether-N,N'-tetraacetic acid) 等を添加することによって, プロテアーゼによる分解や蛋白質の磷酸/脱磷酸化等を含む変性や修飾反応を抑え, バンドに対する影響を最小限にすることができると言われる(大海, 1996a)。そこで, Table 1 の抽出液 S3 を添加した試料からは, より鮮明なバンドが得られた。逆に添加物が一番多い S1 の試料が変色しやすい傾向があった。これは S1 抽出液の中に塩の添加量が多すぎて, SDS の対イオン (Na^+) が陰イオン基の周辺により密に群がり, 蛋白質との結合力が低下したためと考えられる(辻井, 1974)。添加塩の効果については今後更に検討すべき問題が多い。

加熱処理した試料と加熱処理しなかった試料を比べて, 特に差異は認められなかった。一般的に, 試料中に存在するプロテアーゼを失活させるとともに, SDS が 2-メルカプトエタノールの還元によって蛋白質を効果的に結合させる目的で, 加熱処理を行う必要がある(堀尾, 1981)。SDS と蛋白質との結合は, 先ず結合しやすいところに結合し, その結果蛋白質の高次構造が変化し, 更に次に箇所結合するように徐々に反応が進むことに由来する。試料を調製する際に加熱処理を行うのは, この反応を素早く且つ完全に行わせるためである。ところが, 今回の実験の場合は, 試料抽出液に DTT, EDTA, EGTA 等の添加及び後述するように尿素の処理によって, 加熱処理の目的を達することが出来, 100°C の加熱は必ずしも必要ではなかった(大海, 1996a; 1996b)。

試料に尿素 240mg (最終濃度 8M) を添加することで鮮明なバンドが得られた。尿素は SDS と同じようによく使われる一種の蛋白質変性剤である。試料内の不溶性蛋白質, 低分子量の蛋白質が存在する場合は, 試料に最終濃度 8M の尿素を添加することによって, 蛋白質の可溶性を効果的に行うことができ, 分離が改善されると言われる(高木, 1976)。また, 試料内に SDS が存在しても α ヘリックス含量の高い蛋白質もあり, この物質が泳動のパターンに影響するので, 尿素の添加によって, ヘリックス構造を壊し, ランダムコイルに近い構造を全ての蛋白質がとるように変化させ, 満足のいく泳動の結果を得ることが出来る(佐野, 1978)。

尿素を添加するもう一つ目的として, 尿素の添加に

よって試料の比重が高められ, 新たにグリセロールを添加する必要がなくなり, 直接に泳動用の試料液として使える便利さもある。

2. 分離ゲルの作製方法の影響

分離ゲル用重合液に添加した過硫酸アンモニウムと TEMED の最終濃度は 0.025% が適していることが分った。過硫酸アンモニウムと TEMED の濃度は重合液のゲル化に影響があり, この二つの濃度を増減するか, 重合液の注入速度(今回の実験は注入速度を 8 mm/分固定する)を変えることによって, ゲル化の速度を調節することができる。濃度が高すぎる場合には, ゲル化が速すぎて, ゲルの濃度勾配が連続できず, 蛋白質の分離効果が悪い恐れがある。

3. 電気泳動中の電圧の影響

3種類の電圧のかけ方を比べて, BPB のバンドが分離ゲルに入ってから下端に接近するまで電圧を 120 V-150V-180V で徐々に上昇した方がやや良好な効果が得られた。通電初期に低い電圧で泳動を行う理由は, 通電中のゲルの発熱を防ぐためと考えられる。最初から高電圧を流すと, ゲルの突然の発熱によって, バンドが歪むことが多い(堀尾, 1981)。また, 電圧を徐々に上昇させた場合には, 泳動中の蛋白質の拡散が少ないために, 鮮明なバンドが得られると考えられる。

要 約

本研究では, ニセアカシア (*Robinia pseudoacacia* L.) の胚軸から誘導した様々なカルスを分析に適する SDS (sodium dodecyl sulfate) ゲル電気泳動法を確立するために, 試料の調製方法, ゲルの作製方法, 電気泳動方法等を種々検討した。試料を調製するには, 蛋白質の分解, 変性, 修飾の抑制及び不可溶性蛋白質の可溶性をするために, 最終濃度 0.375mM の DTT (dithiothreitol) と 8M の尿素を添加することが必要であった。濃度勾配 (7.5-15%) 分離ゲルを作製するには, 室温でゲル重合液の注入速度を 8 mm/分で添加する過硫酸アンモニウム, TEMED (N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine) の最終濃度が 0.025% が適していた。電気泳動では, 電圧は BPB (bromophenol blue) のバンドが分離ゲルに入ってから下端に接近するまで 120V で 2.5時間, 150V で 2.5時間, 180V で 1時間徐々に上昇した方が, 通電中のゲルの発熱によるバンドの歪みや泳動中の蛋白質の拡散等を防ぐためには効果があり, 鮮明なバンドを得ることが出来た。

文 献

- Buckley, L. G. and R. N. Trigiano 1994 Changes in ovule protein profiles associated with embryogenesis in *Cercis canadensis* (redbud). *Plant Cell Rep.*, **14**: 27-30
- 堀尾武一・山下仁平 1981 蛋白質・酵素の基礎実験法. 南江堂, 東京, 314-333
- 池原征夫・加藤敬太郎 1974 SDS-ゲル電気泳動による膜蛋白の分析法. 蛋白質核酸酵素別冊, **5**: 230-237
- Laemmli, U. K. 1970 Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**(15): 680-685
- Matheka, H. D., P.-J. Enzmann, H. L. Bachrach and B. Migl 1977 The influence of sodium dodecyl sulfate from different sources on the separation of virus proteins in polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal. Biochem.*, **81**: 9-17
- Mayer, J. E., G. Hahne, K. Plame and J. Schell 1987 A simple and general plant tissue extraction procedure for two-dimensional gel electrophoresis. *Plant Cell Rep.*, **6**: 77-81
- Mhatre, M. and Bapat, P. S. Rao & VA 1991 Electrophoretic analysis of Sanadalwood (*Santalum album* L.) protein during morphogenesis. *Ind. J. Exp. Biol.*, **29**: 1150-1151
- 大海 忍 1996a SDS-PAGE はサンプル調製がポイントです. *細胞工学*, **15**(2): 249-251
- 大海 忍 1996b 何でも煮ればいってもんじゃない. *細胞工学*, **15**(3): 383-385
- Roberts, D. R., B. S. Flim, D. T. Webb, F. B. Webster and B.C.S. Sutton 1989 Characterization of immature embryos of interior apruce by SDS-PAGE and microscopy in relation their competence for somatic embryogenesis. *Plant Cell Rep.*, **8**: 285-288
- 佐野 洋・井上英男 1978 SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動速度の異常性. 蛋白質核酸酵素, **23**(5): 361-368
- Shapiro, A. L., E. Viñuela and J. V. Maizel 1967 Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **28**(5): 815-820
- Sotak, R. J., H. E. Sommer and S. A. Merkle 1991 Relation of the developmental stage of zygotic embryos of yellow-poplar to their somatic embryogenic potential. *Plant Cell Rep.*, **10**: 175-178
- Swaney, J. B., G. F. Vande woude and H. L. Bachrach 1974 Sodium dodecylsulfate-dependent anomalies in gel electrophoresis: Alterations in the banding patterns of foot-and-mouth disease virus polypeptides. *Anal. Biochem.*, **58**: 337-346
- 高木俊夫・柳 園江 1976 タンパク質の化学 I, 生化学実験 1, 日本生化学会編, 東京化学同人, 東京, 469
- 辻井 薫・高木俊夫 1974 ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) について. 蛋白質核酸酵素, **19**(9): 705-715

Summary

The method of SDS (sodium dodecyl sulfate) polyacrylamide gel electrophoresis for the analysis of *Robinia pseudoacacia* L. callus was established. To protect proteins in the sample from being proteolyzed, denatured or modified, and to dissolve insoluble proteins, addition of DTT (dithiothreitol) and urea to the final concentration of 0.375mM and 8M respectively was necessary for the sample preparation. Addition of 0.025% of ammonium peroxodisulfate and TEMED (N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine) to the separating gel solution and filling the gel at the impregnation speed of 8mm/min. at room temperature was appropriate for the gradient (7.5-15%) separating gel polymerization. Electrophoresis being carried out with an ascending voltage of 80V for the stacking gel and with 120V (2.5 hours) -150V (2.5 hours) -180V (1 hour) for the separating gel efficiently prevented band distortion and protein diffusion.