



平成23年9月5日
シャープ株式会社
熊本大学
科学技術振興機構(JST)

タンパク質分析装置(2次元電気泳動の完全自動化)の開発に成功

JST研究成果展開事業【先端計測分析技術・機器開発プログラム】の一環として、シャープ株式会社 研究開発本部 健康システム研究所と熊本大学大学院生命科学研究部の開発チームは、タンパク質分子の混合物を全自動で分離できる装置を開発しました。これは、それぞれのタンパク質分子が持つ物理的性質の違いを利用して分離する「タンパク質2次元電気泳動法^{注1)}」の自動化に成功したものです。本装置を使用すると、従来の手作業では2日間かかっていた作業時間が、その10分の1である約100分に短縮できます。また、本装置の分析精度(分解能)は従来法の5倍で、かつ再現性のよい結果をもたらします。

本装置と検査用の専用チップは、医療研究分野向けにシャープマニファクチャリングシステム株式会社が9月から販売開始します。

ヒトの体内には、遺伝子をもとに作られた数万種類ものタンパク質があります。体調変化や疾病などは、これらのごくわずかな変化が引き金となって起こります。近年、タンパク質の微細な変化を捉えて病気予防につなげる研究やその成果をデータベース化する「プロテオミクス^{注2)}」とよばれる研究が進められており、世界規模で注目されています。しかし、この分野で従来から行われてきた2次元電気泳動法は操作が非常に難しく、熟練した研究者が数日かけて作業しなければ、再現性のよい結果が得られませんでした。

シャープは今回、2次元電気泳動法を完全自動化し、一度に約1000種類のタンパク質を100分もの短時間で精度よく分離する装置の開発に成功しました。本装置は、多くのタンパク質の微細な化学的变化を、より正確に短時間で再現性よく検出できます。この成果は、プロテオミクス分野の基礎・応用研究を大きく発展させるものです。

本装置は、タンパク質それぞれの電荷や分子の重さといった固有の性質の違いを利用し、等電点^{注3)}で0.02pH、分子量^{注4)}で2kDaもの分解能で分離できます。この分解能は、タンパク質に1分子のリン酸が付くという、従来法では分離できなかった変化をも見分けることが可能です。

熊本大学大学院生命科学研究部の荒木令江准教授は、本装置を用いて多数の脳腫瘍のタンパク質解析を行ないました。その結果、ビメンチン^{注5)}と呼ばれるタンパク質にリン酸が付加する現象(リン酸化^{注6)})が、がん化に関連することがわかりました。また、リン酸化だけでなくビメンチンの変化のパターンを解析した結果、本装置を使用すると、特定の抗がん剤に対する「効きやすさ」が分析可能であることを見出しました。

なお、本成果は2011年9月7～9日に開催される「分析展2011/科学機器展2011」のJSTブースにて展示すると共に、9月8日の成果発表会で口頭発表します。

成果発表会申し込み URL: <http://www.sci-news.co.jp/jst110908>

本開発成果は、以下の開発課題によって得られました。

事業名: 研究成果展開事業【先端計測分析技術・機器開発プログラム】
プロトタイプ実証・実用化タイプ

開発課題名: 「全自動2次元電気泳動・ウェスタンブロットティング装置の開発」

チームリーダー: 鶴沼 豊(シャープ株式会社 研究開発本部 健康システム研究所 第二研究室 室長)

開発期間: 平成21～23年度(予定)

担当開発総括: 尾形 仁士(三菱電機エンジニアリング(株)相談役)

JSTはこのプログラムのプロトタイプ実証・実用化タイプで、プロトタイプ機の性能の実証ならびに高度化・最適化、あるいは汎用化するための応用開発を行い、実用化可能な段階まで仕上げることを目的としています。

<開発の背景と経緯>

2003年にヒトの全遺伝子解読が完了して以来、遺伝子に記録された設計図から生命活動を解読する研究が活発化しました。病気になるメカニズムの理解や一人一人の個性の違いも研究対象となり、遺伝子の解読装置も高速化しています。

しかし、生命活動を実際に担うのは、遺伝子をもとに作られる多くのタンパク質です。これらは、合成された後に受ける化学的な修飾や分子の切断などによって変化し続けます。具体的には、数万種類の遺伝子から合成されるタンパク質は、その10倍の数十万種類にも上ります。また、同じ遺伝子を持っていても機能が異なる細胞では合成されるタンパク質が異なり、癌化した細胞のタンパク質は、正常時と異なる化学変化を受けています。つまり、病気などのメカニズムや薬の効き方などを解明するためには、遺伝子だけではなく、タンパク質を網羅的に研究する必要があります。

こうした、タンパク質の種類や変化を研究する学問分野は、プロテオミクスと呼ばれ、近年大きな注目を集めています。しかし、従来から行われてきた2次元電気泳動法と呼ばれる分析法は、操作が非常に難しく、再現性のよい結果を得るためには、熟練した研究者が数日かけて作業する必要がありました。そのため、多くのタンパク質の変化を網羅的に研究するためには、簡易で高速なタンパク質解析手法の開発が求められています。

シャープは2009年から、JST研究成果展開事業【先端計測分析技術・機器開発プログラム】にて熊本大学大学院生命科学研究部と共同で、2次元電気泳動法と分離したタンパク質を分析する手法の自動化技術の実用化にむけて開発を行っています。この度、全自動の2次元電気泳動装置の開発に成功しました。今回開発した装置を用いると、従来法と比べて約10分の1の時間で、誰が操作しても再現性のよい結果を得られます。さらに、従来法に比べ約5倍の分解能を有しているため、疾病のパターンなどをより正確に分析することが可能となります。

本装置は、測定用サプライ品とともに、シャープマニファクチャリングシステム株式会社より9月中に研究機関向けに発売されます(写真1)。

<開発の内容>

2次元電気泳動法は、各タンパク質分子の持っている2つの物理的性質(等電点、分子量)の違いを利用して、タンパク質の混合物を2次元的に分離する方法です。実際には、タンパク質の混合物を特殊なゲルの中を通過させることで、分子量や等電点の違いで分離します。1次元目の分離は、タンパク質のもつ電気化学的性質の一つである等電点の違いを利用して行います。細長い分離用ゲル^{注7)}上に、何種類ものタンパク質が含まれる試料を置いて高電圧をかけます。すると、それぞれの等電点の値に応じてタンパク質が分離します。2次元目の分離は、タンパク質の分子量の違いを利用して行います。1次元目の分離が完了した分離用ゲルを、長方形の2次元目ゲルの一辺に接続します。そこに電圧をかけると、分子量に応じてタンパク質を分離することができます。最終的には、矩形のゲルシート内に、分離された各タンパク質を、それぞれ異なる点として確認することができます。

従来法では、2次元電気泳動の一連の操作は全て手作業で行われていました。これらの操作は煩雑で、再現性の良い結果を得るためには高度な技と熟練が必要でした。また、分析開始から結果を得るまでに2日間かかるため、大量のサンプル分析を必要とする臨床研究においては、ごく限られた利用に限られていました(図1)。

本開発チームは、自動化における課題となっていた、変形し易く取り扱いが困難な分離ゲルの搬送機構と精密位置制御機構を開発し、自動化に成功しました。また1次元目電気泳動に高電圧を加えるための精密制御システムを開発し等電点の分離性能を改善しました(図2)。これらの技術開発により、分析試料等のセッティングをした後は、ボタン一つで2次元電気泳

動の結果を得ることができます。しかも、分離時間は100分という短さで、従来の約10分の1です。また、疾病等に関する重要な化学変化であるタンパク質のリン酸化の有無を、リン酸分子ごとに分離可能な高分解能を実現しました。これらの性能向上に加えて、全作業を自動化したことで手作業による誤差がなくなり、各タンパク質のスポット位置、スポット強度の再現性が向上しました。これは、従来困難であったサンプル間の定量的な比較を可能とするものです(表1)。

熊本大学大学院生命科学研究部の荒木令江准教授は、本装置を用いて多数の脳腫瘍サンプルのタンパク質解析を行ないました。その結果、タンパク質のリン酸化に由来するスポット位置の変化から、抗がん剤の効きやすさの違いと、その薬効のメカニズムを解明するための有益な結果が得られました(図3、図4)。

<今後の展開>

今回開発した装置は、全自動かつ短時間で2次元電気泳動結果をもたらします。これにより、大量の臨床データを処理することが必要であった疾病プロテオミクス分野でも、広く2次元電気泳動法を用いることが可能となります。さらに、医学研究のみならず、製薬業界や食品検査等でタンパク質を網羅的に分析したり、微細な化学変化を含む分析が必要とされる分野でも、本成果の利用が期待されます。

本開発課題では、現在、2次元電気泳動で分離したタンパク質を、ウェスタンブロッティングと呼ばれる技術を用いて同定するところまでを全自動化する機構の開発も行っています。これが実現されると、プロテオミクス研究のさらなる加速につながり、当該分野の発展に大きく貢献することができます。

<用語解説>

注1) 2次元電気泳動法

タンパク質を分析する方法の一つ。先ずタンパク質の持つ等電点(注3)の違いによってタンパク質を分離した後、タンパク質に SDS(ドデシル硫酸ナトリウム)により負電荷を持たせ、矩形の2次元目の電気泳動ゲルに接続し分子量(注4)の大きさで分離する。

注2) プロテオミクス

遺伝子(ゲノム)を網羅的に研究する分野であるゲノミクスという言葉とタンパク質を意味する英語プロテインから作られた、タンパク質を網羅的に研究する分野。疾病や成長などの生命現象を解明するにあたり、プロテオミクスはゲノミクスよりも多くの情報を与えると言われている。

注3) 等電点

タンパク質の持っている電気化学的な性質。タンパク質は水に溶けた状態では周りのpH により電荷が変化している。等電点とは、タンパク質の電荷がゼロとなるpH のことを指す。pH が酸性から塩基性まで勾配を持つゲルにタンパク質を導入し、電圧を印加すると、タンパク質はその電荷によって力を受けて移動するが、電荷がゼロとなる場所に到達すると動けなくなる。これを等電点電気泳動と言い、タンパク質の分離方法として使われる。リン酸化により等電点は、0.1~0.05 程pH が変化する。

注4) 分子量

分子の重さ。タンパク質は20種類のアミノ酸が数100個結合した紐状の分子であり、分子量はDa(ダルトン)という単位で呼ばれ、数1,000Da から数100,000Da。2次元電気泳動の2次元目電気泳動では小さな分子量のタンパク質は早く進み、大きなタンパク質はゲルの網目の影響で遅くなるため、一定時間の電気泳動後、分子量の相違による分離を得ることができる。

注5) ビメンチン

細胞の形を形成するタンパク質(細胞骨格タンパク質)の一種。細胞増殖に関係すると言われているが、役割は謎が多い。

注6) リン酸化

タンパク質にリン酸基を付加させる化学反応。多くのタンパク質で生じる反応であり、タンパク質の機能が働く際、リン酸化によりスイッチのオン・オフが制御されていると言われている。リン酸化を起こすのもタンパク質(リン酸化タンパク質)であり、リン酸化タンパク質がリン酸化を開始するのも自身のリン酸化の場合が多く、カスケード的な反応のネットワークを形成して生物の機能を担っている。癌化において、タンパク質のリン酸化は重要なファクターとなっている。高分解能の2次元電気泳動によりリン酸化を分離できる。

注7) 分離用ゲル

水を80%以上含む寒天状の物質であり、多くの場合、アクリルアミドの重合体が用いられる。変形し易く、取り扱いには習熟がいる。1次元目電気泳動(等電点電気泳動)用のゲルはストライプ状で、酸性から塩基性へのpH勾配が形成されている。2次元目電気泳動用のゲルは分子の網の目状構造を利用してタンパク質分子の大きさでふるい分ける。

<お問い合わせ先>

<開発装置に関すること>

シャープ株式会社 研究開発本部 健康システム研究所 第二研究室
〒261-8520 千葉県美浜区中瀬1-9-2
Tel: 043-297-1221(大代表)

<販売装置に関すること>

シャープマニファクチャリングシステム株式会社 第4機器部
〒581-8581 八尾市跡部本町4丁目1番33号
Tel: 0729-91-0681(代表)

<熊本大学に関すること>

※ご記入されますか?

<JSTの事業に関すること>

安藤 利夫(アンドウ トシオ)
科学技術振興機構 産学基礎基盤推進部(先端計測分析技術・機器開発担当)
〒102-0075 東京都千代田区三番町5 三番町ビル
Tel: 03-3512-3529 Fax: 03-3222-2067 E-mail:sentan@jst.go.jp
ホームページ:<http://www.jst.go.jp/sentan/>

<報道担当>

シャープ株式会社 広報室
〒545-8522 大阪市阿倍野区长池町22番22号
Tel: 06-6621-1221(大代表) E-mail: kouhou@sharp.co.jp

科学技術振興機構 広報ポータル部
〒102-8666 東京都千代田区四番町5番地3
Tel:03-5214-8404 Fax:03-5214-8432
E-mail: jstkoho@jst.go.jp

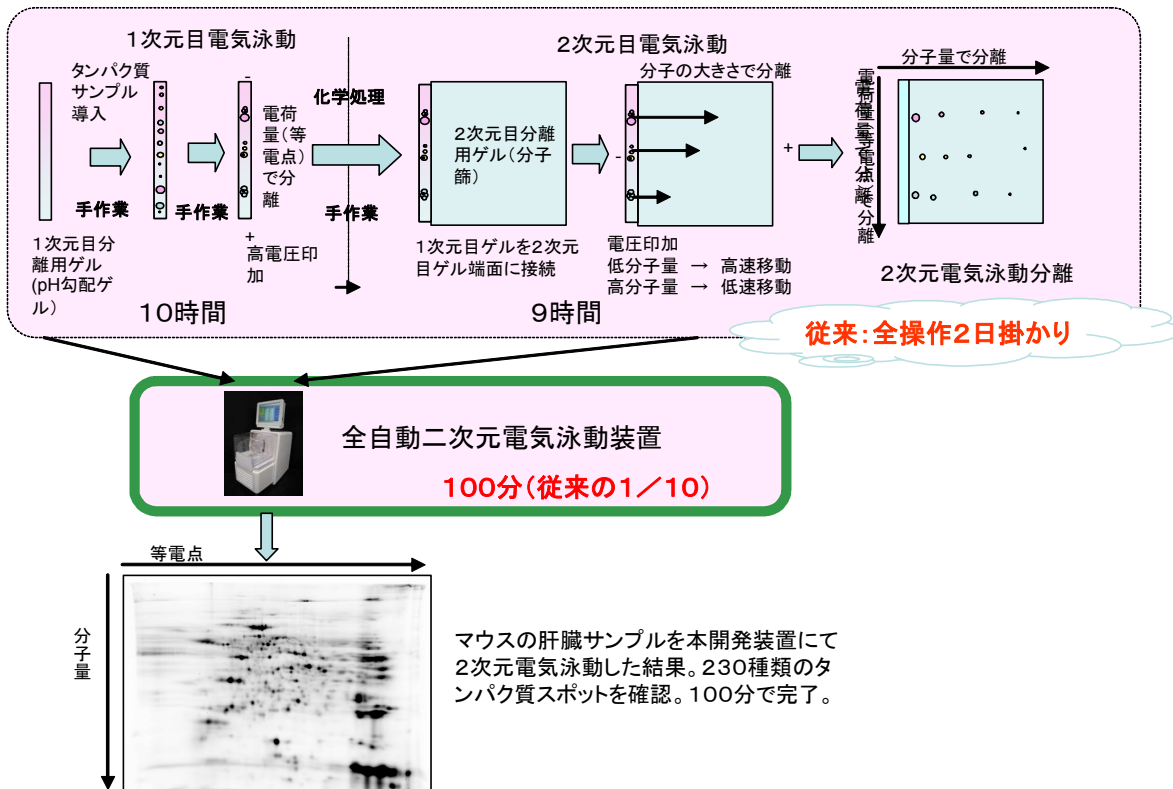


図1 二次元電気泳動法と全自動化

二次元電気泳動はタンパク質のもつ2つの性質(電荷量と分子量)で分離する方法。1次元目分離用のゲルにタンパク質を導入して電圧を印加するとそれぞれの等電点(電荷量と関連する値)で決定される位置にフォーカスされる。2次元目の分離用ゲルの端面に1次元目電気泳動後のゲルを接続し、電圧を印加することにより分子量の差によるゲル中の泳動速度の差により分離され2次元の分離が完了する。従来はすべて手作業で2日間要した操作を全自動化し100分での完了を達成した。



写真1 全自動2次元電気泳動装置

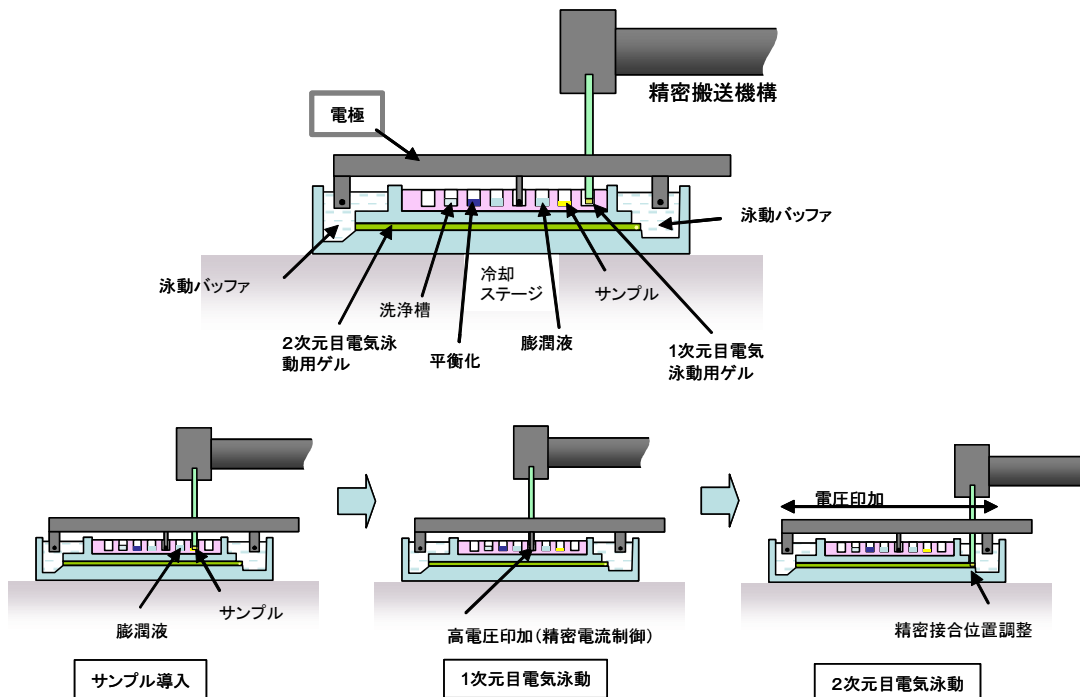


図2 全自動2次元電気泳動装置の内部機構図

1次元目ゲルを端面に配した支持基板を精密搬送機構が自動搬送。1次元目ゲルへのサンプル導入の後、1次元目泳動位置へ搬送し、高電圧を印加し等電点電気泳動。終了後、化学処理を自動で行い、2次元目ゲル端面へ移動。接続位置の精密制御(1 μ m単位)の後、電圧を印加して2次元目電気泳動。サンプル、バッファ等をチップへセットの後、完全自動で分離終了。

要素技術	従来技術	本開発
操作性	ゲルの取り扱いに熟練が必要	新機構によりゲル接続を含めて完全自動化、誰でも同一結果
再現性	手操作の僅かなずれが結果に影響	自動化により高い再現性→定量的分析が可能
分解能	~0.1pH	0.02pH タンパク質のリン酸化によるシフト(0.1~0.05pH)を分離可能
分析時間	2日間を要する	100分間 短時間化により、臨床研究に必要とされる多数サンプルを分析可能

表1 従来技術との比較

ビメンチンタンパク質(癌化に関係:リン酸化酵素による修飾、カルパインやカスパーズによる切断等によって15種類のスポットに分離される)

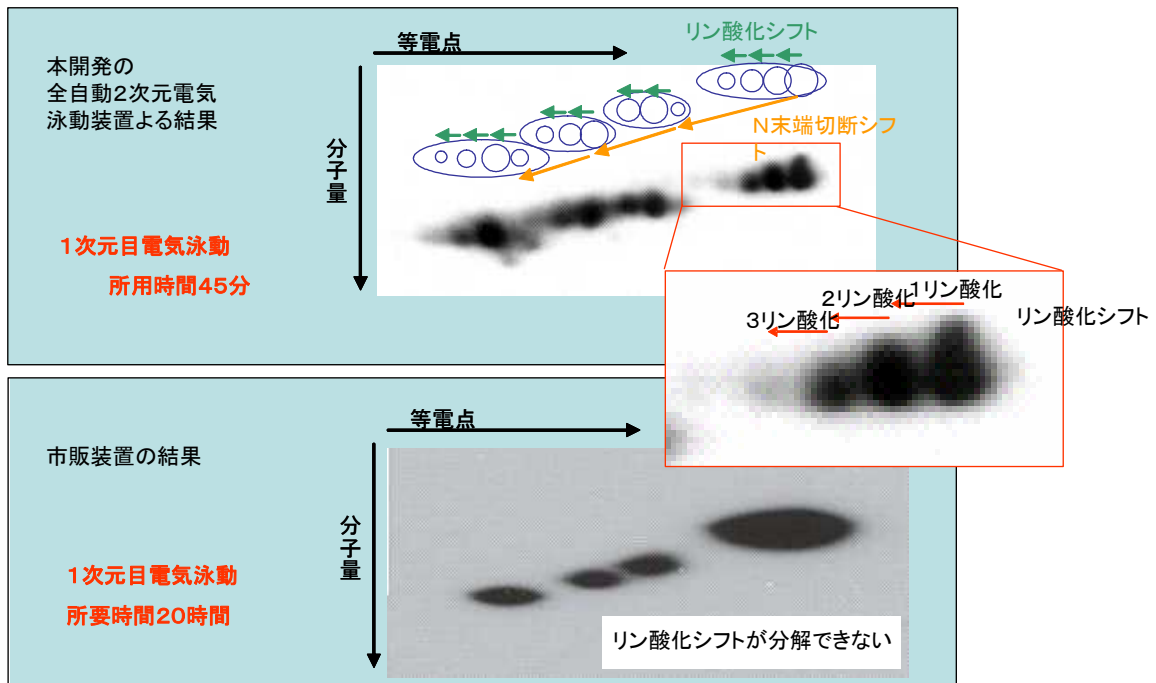


図3 本開発装置を用いたビメンチンタンパク質の分離

本開発装置は1次元目電気泳動において高電圧(~9000V)印加が可能であるため、短時間で高分解能分離結果を得ることが可能。疾病等に関わるタンパク質のリン酸化シフト、N末端の切断が分離可能。

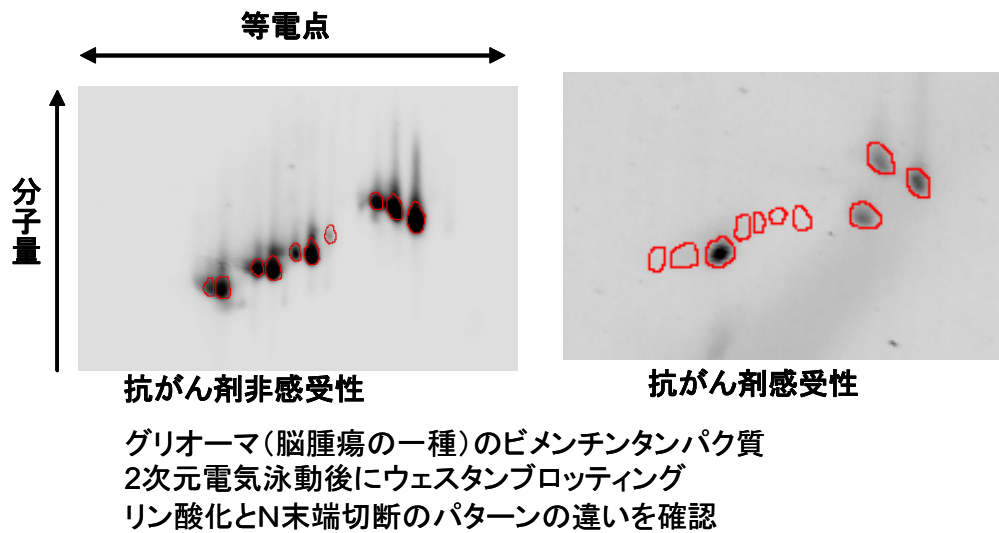


図4 抗がん剤の感受性・非感受性を2次元電気泳動パターンで判断可能

共同研究者の熊本大学・荒木研究室にて、本開発2次元電気泳動装置を用いて脳腫瘍(グリオーマ)患者のサンプルを分離。脳腫瘍の治療に用いられる抗がん剤が効く(感受性)患者さんと効かない(非感受性)の患者さんがおり、本装置を用いた2次元電気泳動によりビメンチンのリン酸化パターンに明確な相違があることが明らかとなった。