

クラゲタンパク質の分子量測定 [総合科学系 15 期 15 班]

研究の経緯

- ・ミズクラゲ抽出画分の細胞接着阻害活性の検証実験 (2011 年度)
金魚鱗の表皮細胞増殖を阻害することを確認
- ・金魚鱗の表皮細胞増殖阻害およびプラナリア再生芽細胞の増殖についても阻害することを確認
ムラサキイガイの足糸について接着忌避の可能性を確認 (2012 年度)
- ・クラゲ抽出画分がタンパク質から構成されていることを検証し、分子量の測定に取り組む

目的

金魚の鱗の表皮細胞の増殖やプラナリアの再生芽細胞の増殖の阻害、また、ムラサキイガイの足糸の接着忌避ができるクラゲのタンパク質抽出画分に含まれるのはどのようなタンパク質なのかを分子量を測定することにより調べること。

クラゲとは

クラゲの一種で日本近海でも最も普通に観察が可能で
生殖腺が 4 つあるのが特徴で毒性が少ないため今回用いた



実験方法

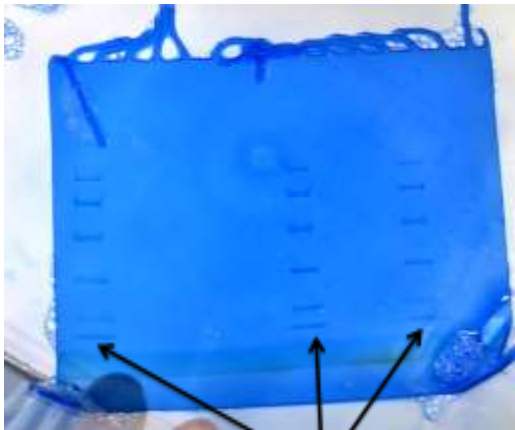
[実験①]

- 1 4℃で冷却しながらカッターナイフでリン酸バッファ溶液中でミズクラゲを破碎した
- 2 NaCl を添加後、1℃で冷却しながら高速遠心分離機にかけ上澄みを取り出した。
- 3 セロハンチューブで透析を行い塩分濃度を 0.14%まで下げ、その後透析後の溶液を使って電気泳動を行った。

	測定した溶液	ABSピーク値	波長(nm)
A	クラゲ抽出溶液の 高速遠心分離後 の上澄み	0.834	280
B	(A)を塩分濃度 0.14%に 透析した画分	0.467	280

[結果]

試料のバンドパターンは発現せず、指標のマーカーのみが見られた。



指標マーカ-

透析した
クラゲ抽出画分
の電気泳動図

[考察]

試料バンドパターンが見られなかったのは、透析後のクラゲ抽出画分の
タンパク質濃度が低いことが原因でないかと考えた。

そこで電気泳動により、タンパク質濃度を高められると考え、次の実験②に移った。

[実験②]

- 1 簡易泳動装置を用いて 3 時間電気泳動を行った。
- 2 陽極付近に集積した微小白粒を含む溶液をピペットで採取。
- 3 この溶液を 6 3 時間凍結乾燥機にかける。
- 4 1 8 mg の白色粉末を得る。



簡易電気泳動



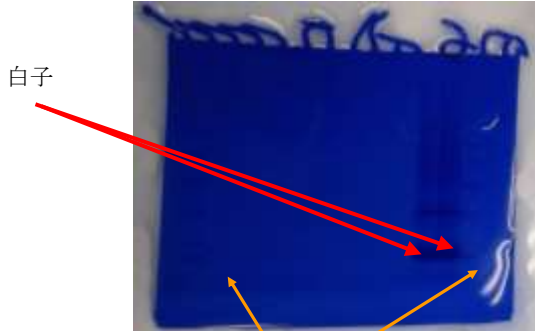
凍結乾燥機



白色粉末 1 8 mg

[結果]

先ほど白色粉末を電気泳動にかけたが、試料のバンドパターンは確認できなかった



白子

指標マーカ-

対照実験として
白子を用いた

白色粉末の電気泳動

[考察]

クラゲ抽出画分が糖タンパクと仮定した場合、電気泳動による分子量測定のために
糖鎖を切断する必要がある。

[実験③]

- I 白色粉末 18μL と水 18μL を用意する
- II この 2 つの溶液にそれぞれバッファを 2μL が加えてマイクロチューブにいれる
- III これらを 99℃で 10 分間加熱して、遠心分離を施す

[結果]

クラゲ抽出画分の糖鎖を切断して電気泳動にかけたがバンドパターンは確認できなかった

[考察]

今までの実験を踏まえて、クラゲの破碎方法をかえた。

[方法]

ミズクラゲを液体窒素を用いて凍結させて、プロテアーゼ阻害剤とリン酸バッファを加えて、
乳鉢ですりつぶし、遠心分離を施して上澄みを採取した

[結果]

この溶液を前回と同様に電気泳動にかけたが、試料のバンドパターンは確認できなかった



[実験④] (タンパク質の糖鎖を切断してみる)

NEW ENGLAND の Protein Deglycosylation Mix という全糖鎖の切断が可能な酵素カクテルを
用いて、糖鎖を切断して電気泳動を試みた
しかし、結果は前回同様、試料のバンドパターンは確認できなかった。

[実験⑤] (タンパク質試料中の塩分を完全に除去してみる)

非常に強力なタンパク質沈殿剤である TCA (トリクロロ酢酸) を用いた手法をおこなった

- 1 組織を直接 10~20%TCA 内でクラゲをよくすり潰して懸濁液にする
- 2 水中で 30 分培養し、5 分後 12000×g で遠心する
- 3 ペレットを氷冷アセトンまたはエタノールで洗い TCA を完全に除去する
この手順で行ったが、やはり結果はえられなかった

今までの考察

これまでの実験でタンパク質が複合タンパクの可能性が高まった。複合タンパクは通常の SDS-PAGE 電気泳動の手法では難しいため、一次の電気泳動として等電点電気泳動により試料を分離する処理が必要だと思われる。これについて、文献調査をした結果 BN-PAGE という方法がふさわしいのではないかと考えた。いずれにしても二次元電気泳動による処理が必要だと思われる。さらに、金魚鱗の表皮細胞接着阻害やプラナリア再生芽細胞の増殖阻害、ムラサキイガイの足糸について接着忌避に関連するタンパク質の特定につながると考える。