

高等学校の実験環境における大腸菌由来ヒートショックプロテイン (HSP) の検出

石川県金沢泉丘高等学校 2年

加藤 晴香 伊藤 浩人 寺下 岳利 由井 嵩朗

1. 要旨、概要

1962年にリトサ博士によりショウジョウバエの幼虫から熱刺激で新たなパフが発現することが発見された。後にそのパフから生産されるタンパク質が発見され、このタンパク質はヒートショックプロテイン (以下 HSP) と呼ばれている。HSP はタンパク質の変性によって起こされる病気 (白内障、アルツハイマー症候群、ガンなどのフォールディング病) の治療に応用できると考えられており、実際に既に化粧品 (ドモホルンリンクル 再春館製薬) に応用されている。

私たちはこの HSP に魅力と有用性を強く感じ、このタンパク質に関する研究を高等学校で行うことで、高校生ならでの視点から HSP の新たな可能性を発見できるのではないかと考えた。

しかし、高等学校の実験室でタンパク質についての研究を行うのは極めて異例である。そこで私たちは、比較的扱いが容易である大腸菌を用いることでこの研究を可能にできるのではないかという仮説を立て、このための実験系を確立することを研究目的とした。

私たちの高校の実験室には、先進的な実験設備がなかったため、先行研究にのっとりた方法を用いて実験をした。振とう培養法により培養した大腸菌からフリーズ・ソー法によって抽出したタンパク質について、電気泳動法を用いることで HSP の有無を確認しようと試みたが、HSP と判断できるようなバンドは確認できなかった。

そこで、電気泳動法を行う前に抽出液に親和性クロマトグラフィーを施したところ、先行研究の HSP の分子量と類似したバンドが確認され、さらにこのバンドを形成するタンパク質が

持つ ATP 分解活性、分光光度計のデータによりこの HSP であると推定された。

以上をもって、私たちは実験環境を確立することができたと結論付けた。しかし、私たちが発見したバンドが、本当に HSP であるのか、また、HSP の発現は、本当に熱刺激などのストレスによるものなのか、これらを断定することはできなかつたため、さらなる詳しい検証が求められる。

また一般的な研究機関では植物の HSP についての研究が動物のものに比べると少ないといわれているが、植物の扱いは動物に比べて倫理的な観点などから容易だと言える。よって高校生でも植物の HSP の研究は可能だと思われる。これにより、植物の HSP の研究に高校生の新たな視点を加えることが期待できる。

2. 研究目的

私たちは当初、HSP が野菜の鮮度保持方法の 1 つである 50°C 洗いに関係していると記載している伊藤要子氏の論文に疑問を覚え、野菜などの植物を用いて 50°C 洗いをはじめとした鮮度保持方法と HSP の機能との関連性を調べたいと考えていた。しかし、専門的な知識や設備が不足している高等学校の実験環境において段階を踏まずに応用的な研究を行うのは極めて異例かつ困難である。そこで、私たちは比較的扱いが容易な大腸菌を用いることによって高等学校の実験環境においてもタンパク質についての研究が可能になるという仮説を立て、その最初の一步として大腸菌の培養やタンパク質の検出が可能である実験系を構築し、実際にその系を用いて HSP を検出することを目的として研究を行った。この研究において大腸菌を用いたのは、比較的飼育や保存などの

手間がかからず、より均一な条件の試料を得やすいなど、実験に用いる際の扱いが容易なためである。

高校の実験環境において大腸菌由来の特定のタンパク質の検出が可能になれば、高校生が学習の一環として大腸菌やタンパク質の研究を行う際のハードルが下がるため、より実践的な知識と技術を体感し、身につけることができる。このため、教育的な観点から生物学の発展に寄与することが期待できる。

また、先述の通り HSP はほとんどすべての生物に普遍的に存在する分子シャペロンとしての機能を持つ、生体防御タンパク質である。この機能はあらゆるストレスに対し非特異的に発揮されるため、HSP を研究することは植物を含むあらゆる生物種のタンパク質異常を原因とする病気への有望なアプローチと言える。

3. 研究方法

私たちは実験に大腸菌 BL21 株と DH5α 株を用いたが、これらは遺伝子組み換えがなされているため、文部科学省が定めている遺伝子組み換え生物の拡散防止措置を遵守する必要があった。

遺伝子組み換え生物の拡散防止措置の中でも私たちが守るべき基準は P1 レベルという最低ラインのものであり、

- ・大腸菌を不活化させる設備があること
- ・密閉環境を作れる実験室であること
- ・使用した実験器具を滅菌する設備があること

などの条件を満たす必要がある。

そのため私たちは

- ・実験を行う生物準備室を密閉環境にするために、窓やドアを閉めて実験を行う
- ・圧力鍋と同じ原理で 121°C の高温高压条件を作り出し、使用した菌体や、菌体が付着した実験器具の滅菌を行うことができるオートクレーブを実験室に設置する

- ・実験に用いる器具を 180°C の高温乾燥下に 20 分間おき、あらかじめ滅菌しておくことで、研究したい菌株以外の雑菌による実験結果への影響を避けることができる乾熱滅菌法を行う

これによって基準を満たし、実験に進んだ。

まず大腸菌 BL21 株、DH5α 株をインキュベーター内 (37°C) で静置培養法により LB 寒天培地で培養し、4°C (冷蔵庫内) で保存した。

続いて予備実験として実験 1 を行った。その後、結果を踏まえつつ実験 2、実験 3 を行った。

4. 実験 1

- ・方法

実験で使用する大腸菌をどのようにすればうまく培養できるかを調べるため大腸菌 BL21 株、DH5α 株の 2 種類の大腸菌をそれぞれ作成した LB 液体培地 30,40,50,60°C で一晩培養した。培養は振とう培養装置 (125 回/分) を用いて行った。寒天培地に生やしたコロニーをすくい取って培養液に投入し、放課後から翌朝まで振盪した。培養温度は水温を変えることで調整した。実験結果は目視により評価した。

- ・結果

BL21 株においては、30,40°C においてよく培養が進み、50°C では少ししか培養が進まず、60°C では培養できなかった。DH5α 株においては、30,40°C においては培養が進んだが、それより高い温度では培養が進まなかった。

5. 実験 2

- ・方法

作成した LB 液体培地で、大腸菌 BL21 株を振とう培養装置を用いて 26°C,40°C で一晩培養し、培養液をエッペンドルフにとり、遠心分離機で菌体を沈殿させた。その後菌体を緩衝液にけん濁し、冷凍庫で凍結させ、解凍したものに再び遠心分離機を用いて菌体を沈殿させ、得られた菌体をフリーズ・ソー法を用いて破碎し、

緩衝液でタンパク質をけん濁した。最後に沈殿を取り除き、電荷をもった試薬を入れて電気泳動法を適用してタンパク質の分子量ごとの分離を試みた。培養温度は実験 1 の結果を踏まえて決定した。

・結果

電気泳動は 3 回行ったが、ゲルに現れたバンドの濃さは一様ではない上に薄く不明瞭であり、さらに、現れたタンパク質には HSP 以外のものと思われるものも多く混じっていた。

6. 実験 3

・方法

振とう培養法を用いてこの菌体を 26°C で一晚培養した後、培養液を約 100 倍に希釈し、2 本のフラスコに分け、26°C で引き続き培養した。翌朝新たに 26°C 培養を開始し培養液の吸光度をはかり、培養の進行度を確認した。OD₆₀₀ が 0.6 に達したとき、2 本のうち片方を 40°C に設定した培養装置に移し引き続き培養した。遠心分離によって集菌を行い、得られた菌体を実験 1 同様フリーズ・ソー法を用いて破碎した。フィルターによるろ過法を用いて抽出物を得た後、親和性クロマトグラフィー(シグマ社製 ATP アガロース)を用いて ATP 結合タンパク質の精製を行った。得られたフラクション(fr.)について分光光度計を用いてそれぞれ波長が 260nm,280nm の光を当てた際の ABS を測定したのち電気泳動法を適用し、ゲルに CBB 染色を行った。その後 CBB 染色法より感度が高い銀染色法によってタンパク質を染色した。これらの実験は北陸先端科学技術大学院大学の島原先生の指導のもと行った。

・結果

分光光度法によって得られた各フラクションの ABS を図 1 に示した。

CBB 染色の結果、実験 2 よりもより濃いバ

ンドが現れた。しかし、破碎後抽出物 fr.

0、非吸着画分 fr.3,5,7,9,13,17,18 を流した部分にしかなバンドが確認できなかった。図 2 は、銀染色法を施したゲルを示す。左から分子量マーカー(M)、破碎後抽出物 fr.0、非吸着画分 fr.1,3,5,7,9、吸着画分 fr.19,21 を示す。銀染色の結果、fr.19,21 を流したレーンに分子量 60-80 kDa の領域にバンドが 2 つ見られるようになった。そのうち分子量が高いものが DnaK、低いものが GroEL であると考えられる。加えてその他の領域に数本のバンドが見られた。そのうち、10 kDa 付近のものは GroES であると考えられる。これらは我々が検出を目指していた HSP である。

7. 考察

これらの実験の結果、検出されたタンパク質は以下の 3 つの根拠により HSP であると推定できる。

- ・検出されたタンパク質のバンドの中に、先行研究の結果に示されている HSP の分子量と非常に近い分子量のものが見られたこと
- ・検出されたタンパク質が HSP と同様に ATP 分解活性を持つこと
- ・検出されたタンパク質が HSP と同様にある特定の波長の光 (260nm,280nm) を吸収すること

高等学校の実験環境で実験を行うには、高速遠心分離機などの実験設備の不足により行うことが可能な実験に限られること、様々な行事による時間的な制約など多くの障害があったが、決して不可能ではないと言える。

また、一般の研究機関とは異なった視点から実験を発展させられるという高校生独自の意義もあると考えられる。

8. 結論

以上の結果より、私たちは高等学校での大腸菌をもちいたタンパク質の研究、および HSP

の検出が可能だと結論づけた。しかしこの研究にはいくつかの問題点があった。それを今後の課題にしていきたいと思う。

問題点、および今後の展望は以下の3つである。

1つ目は、検出されたタンパク質について、これがHSPであると断定するにはデータが不足しているという点である。私たちの行った実験では、検出されたタンパク質をHSPとする根拠が分子量、ATP分解活性、分光光度計のデータ(ABS)の3つしかなく、特に「熱刺激によって発現が促進される」という点についての検証が十分になされていない。結果の信ぴょう性を高めるため、熱ショックの有無など様々な条件を追加して検証を続けていきたい。

2つ目に、研究内容が新規性に欠けるという点である。私たちの研究は先行研究の再現に留まるため、有用な科学的新事実の発見には至っていない。高等学校での大腸菌を用いたタンパク質の研究が可能だという結論は出たものの、そこから自分たちの独自の研究による新たな発見はできなかったというのはこの研究の難点であった。この問題に関しては、この研究成果により期待される、高校教育への貢献による波及効果を回答としたい。

3つ目に、今後の展望として、次年度以降の学年にこの研究に引き継いでもらい、私たちができなかった野菜や植物のHSPの研究など、より発展的な研究によって新たな発見をしてもらいたいと考える。

9. 参考文献

- ・秀潤社 タンパク実験プロトコール 大野 茂男 西村 善文
- ・丸善株式会社 増補版 ラボマニュアル 遺伝子工学 村松 正實
- ・講談社 HSPと分子シャペロン 水島 徹
- ・ヒートショックプロテイン(HSP70)の魅力 <https://www.jstage.jst.go.jp/article/onki/77/>

3/77_222/_pdf

- ・"Discovery of the heat shock response"

Ritossa F (1962)

Cell Stress & Chaperones

- ・ Khandekar et al., PROTEIN EXPRESSION AND PURIFICATION 4,580-584(1993)

10. 謝辞

本研究を行うにあたり、北陸先端科学技術大学院大学の島原秀登助教にご指導いただきました。この場をお借りして感謝申し上げます。本当にありがとうございました。

11. 図表

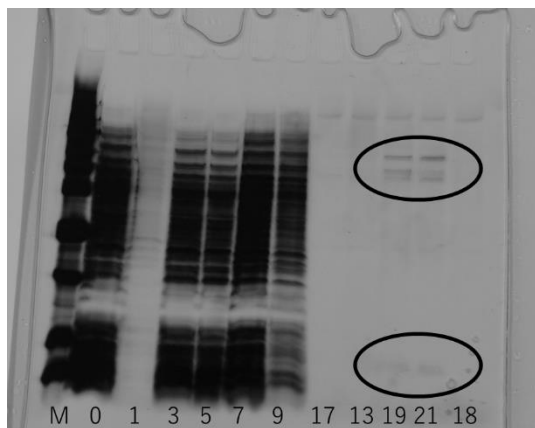


図 1

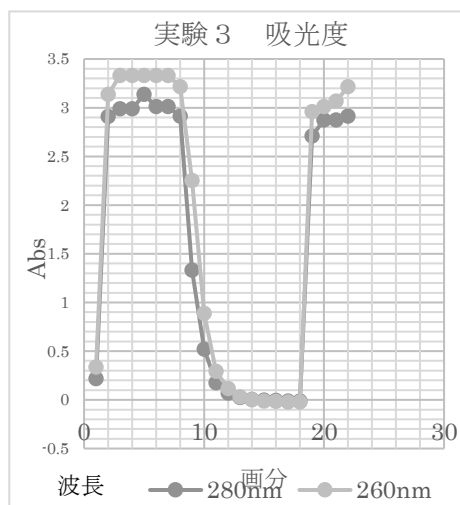


図 2