

実験 電気泳動によるアルコール脱水素酵素の分離と検出

目的 電気泳動という手法によってタンパク質を分離し、アルコール脱水素酵素をその酵素活性を利用して検出する。種が異なればもちろん、外部形態に違いの見られない同種の中にもDNAの塩基置換やタンパク質のアミノ酸置換が含まれていることがあることを理解する。

材料・器具

●ショウジョウバエ

キイロショウジョウバエ *Drosophila melanogater* 上海系統、ナイロビ系統  
オナジショウジョウバエ *Drosophila simulans* 大分系統  
モリシャスショウジョウバエ *Drosophila mauritiana* モリシャス系統

●試薬

麻酔薬 トリエチルアミン  
泳動用緩衝液 トリスーホウ酸－EDTA 緩衝液 (pH8.6)  
泳動用ゲル 寒天ゲル (ポリビニルピロリドンを含む)  
発色試薬 イソプロピルアルコール  
ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NAD)  
フェナジンメソサルフェート (PMS)  
ニトロブルーテトラゾリウムクロリド (NBT)  
発色用緩衝液 0.1M トリスー塩酸緩衝液 (pH8.5)

●磨りガラス、ガラス棒、パスツールピペット、ピンセット、ろ紙片、蒸留水、キムワイプ、電気泳動槽、ブリッジ用ろ紙、水槽、角型ろ紙

方法

【ゲル板の作成】

- 0－1. 常温で固化しているゲルを電子レンジで加熱し溶解する。  
0－2. 駒込ピペットでガラス板の上に溶解したゲルを流し、静置し固める。

【酵素の抽出とゲルへの浸潤】

- 1－1. 磨りガラスに少量 (直径3ミリ以内) の蒸留水を水滴状に置き、麻酔したショウジョウバエを1匹ずつ別々の水滴の中ですり潰す。ハエをすり潰した抽出液はそれぞれを混ぜないように気をつける。  
1－2. 抽出液をろ紙片にしみこませる。  
1－3. ろ紙片をゲルの中央部にゲルを傷つけないように並べ置く。ライン上、1列に6匹分、1枚に12

匹分置く。冷蔵庫で12分、抽出液をゲルに浸潤させる。(低温で処理するのはなぜ?)

【タンパク質の電気泳動】※通電中は泳動槽の中や物に手を触れぬこと。感電します!

- 2－1. ろ紙をていねいに取り除く。  
2－2. 電気泳動槽の緩衝液でブリッジ用ろ紙をぬらし、ゲルの＋側－側にそれぞれ垂らし、泳動槽をまたぐようにゲル板を置く。  
2－3. 直流電源で400V40分通電する。(通電することで何が起こるか?)

【アルコール脱水素酵素の検出】

- 3－1. 発色試薬 (37℃) の中にゲル板を入れ、15分間静かに保温する。(発色が起こるしくみは?)  
3－2. 発色終了後、水槽の中でガラス板からゲルを剥がし、角型ろ紙ですくい取る。泳動結果を記録する。

資料と問い

1. 電気泳動の原理 (アミノ酸の側鎖の電荷とタンパク質の分子構造)

アミノ酸の側鎖 (R) の部分にあるアミノ基 ( $-NH_2$ )、またはカルボキシル基 ( $-COOH$ ) はアミノ酸によって異なる。タンパク質の電荷は、アミノ酸の側鎖の電荷の合計で決まる。

同じタンパク質 (アルコール脱水素酵素) でも、一部のアミノ酸が異なればタンパク質の電荷は異なってくる。このわずかな電荷の差を利用して電氣的に分子を分離する方法が電気泳動である。

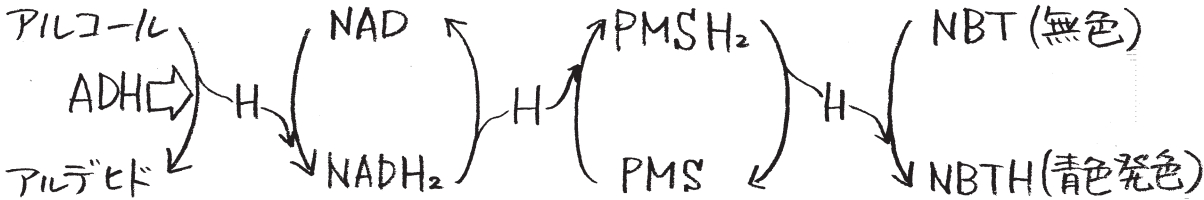
※電気泳動法は、①ほぼ同じ分子量の物質を電荷の差で分離する (本実験) と、②ほぼ同じ電荷の物質を分子量の大小で分離する (いろいろなサイズのDNA断片を同時に泳動させた場合、サイズ＝分子量の大きな断片は泳動しにくい!) とがある。

問1: 側鎖にカルボキシル基をもつアミノ酸に置換された割合の高いタンパク質は、泳動結果が＋極よりになるか、－極よりになるか? ＋極よりに泳動される。

2. アルコール脱水素酵素の検出

ゲルに浸潤し泳動された脱水素酵素がイソプロピルアルコールを脱水素 (酸化) し、化学反応が連鎖的に起こり最終的に無色の NBT を還元し青色に発色させる。青色バンドが現れた場所にこそ脱水素酵素が存在することがわかる。

問2: 発色にいたる反応を書き写せ



3. 複数のバンド (=ザイモグラム) が現れるのは

アルコール脱水素酵素 (ADH) でありながら、電気泳動で異なるザイモグラムになるということは、酵素タンパク質の分子に違いがある = アミノ酸の一部が異なる = 遺伝子の塩基配列が異なる、ということである。このような同じ酵素活性を持つ一群の酵素を「アイソザイム」という。

問3: DNAの一塩基置換は必ずアミノ酸置換として現れるか。アミノ酸置換をもたらさない塩基置換はどのような場合か?

必ずとは言えない。  
あるアミノ酸を指定する3つの塩基のうち、ひとつの塩基が置き換わっても、同じアミノ酸を指定することが結構あるから。

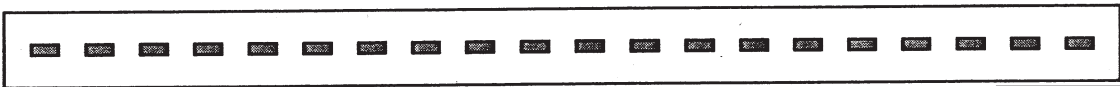
4. バンドの読みとり

異なるザイモグラムが現れた場合には、異なる分子構造のADH (アイソザイム) であると判断できる。しかし、同じ位置のザイモグラムだからといって、同じ分子構造であるとは断定できない。

5. バンドの数と単量体・2量体

多数の同種ショウジョウバエ個体のザイモグラムの現れ方を調べてみたとする。

(1) バンドが1本のみ現れた場合



この種にはアイソザイムは含まれず、ADHはすべて同じものであった = 単型であった、といえる。

(2) バンドが2本現れた場合



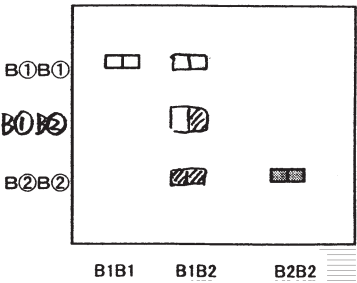
バンドが2本しか現れなかった場合、このタンパク質は単量体で2種類のアイソザイムが含まれていたことを示す。

種Aの酵素をコードする遺伝子座の対立遺伝子をA1, A2とする。遺伝子A1によって合成される酵素をA①、遺伝子A2によって合成される酵素をA②とすると、遺伝子型A1A1の個体 (A1ホモ接合体) はA①のバンドのみを、遺伝子型A2A2の個体 (A2ホモ接合体) はA②のバンドのみを現す。遺伝子型A1A2の個体 (ヘテロ接合体) はA①とA②の2本のバンドが現れる。

※タンパク質の4次構造とは、複数のペプチド鎖が組み合わさってできる立体構造を示す。1本のポリペプチドからなるタンパク質を単量体、2本のポリペプチドからなるタンパク質を2量体と呼ぶ。

(3) バンドが3本現れた場合

ADHのタンパク質は2本のペプチドが組み合わさった2量体である。種BのADHをコードする遺伝子座の対立遺伝子をB1, B2とする。遺伝子B1はポリペプチドB①を、遺伝子B2はポリペプチドB②を合成するが、ADHの酵素活性を持つには2つのポリペプチドが組み合わさって2量体になる必要がある。遺伝子型B1B1の個体はB①B①のバンドのみを、遺伝子型B2B2の個体はB②B②のバンドのみを現す。



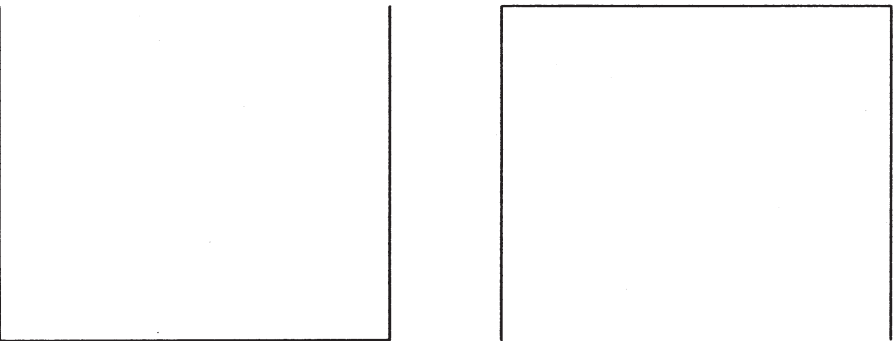
問4: では遺伝子型B1B2の個体はどのようなバンドを形成するか?

(細胞内に合成されたB①とB②は、ランダムに出会い2量体に組み合わさる)

上図のように、3つのバンドを形成する。中央のB①B②のバンドは2倍量できるので、太く濃くなる。

結果と考察

1. 泳動結果 (ザイモグラム) を書き写せ。



2. (高校最後の!?) この実験を通して何を学べたか。知的に面白かったことを挙げてみよ。