

組換え GFP（緑色蛍光タンパク質）を用いたタンパク質の 学習プログラムの開発

*石 澤 公 明・**知 識 麻友子

Learning programs to understand characteristics of proteins with recombinant GFP (Green Fluorescent Protein)

ISHIZAWA Kimiharu, CHISHIKI Mayuko

Abstract

Green Fluorescent Protein (GFP) is a protein purified from the jellyfish, *Aequorea victoria*. The modified GFP gene has been inserted into *pGLO* plasmid and now is available from Bio-Rad Laboratories for educational application of studies on biotechnology or molecular biology. Recombinant GFP expressed in *E. coli* transformed with *pGLO* is a highly potent tool for “protein literacy”. We proposed an experimental protocol constituted of a few GFP purification methods, which are useful for high-school students and undergraduates to learn the biochemistry of proteins, and introduced an example of the practice in the school.

Key words : GFP、組換えタンパク質 (Recombinant Proteins)
緑色蛍光タンパク質 (Green Fluorescent Protein)
生物教育実験 (Educational Biology Experiment)
タンパク質の精製 (Protein Purification)

I. はじめに

GFP は Green Fluorescent Protein（緑色蛍光タンパク質）の略称で、オワンクラゲ (*Aequorea victoria*) が持っている緑色蛍光を発するタンパク質である。GFP を単離・精製した下村脩博士は、コロンビア大学マーティン・チャルフィー教授、カリフォルニア大学ロジャー・ヨンジェン・チェン教授と共に、「GFP の発見とその応用」が評価され、2008年度ノーベル化学賞を受賞した。GFP は、238アミノ酸からなる分子量が27,000のタンパク質である。オワンクラゲの生体内で、GFP はイクオリンと複合体を形成し、細胞内

カルシウムの変動でイクオリンが発光（最大波長 430nm）すると、その光で GFP が励起され、緑色の蛍光（最大波長508nm）を発する。GFP の発色団は分子内のアミノ酸残基で形成されており、補助因子や基質を必要としない (Heim et al., 1994)。発色団の形成に酵素反応を必要としないことや、異種生物への GFP 遺伝子の導入が可能になったこと、また他のタンパク質との融合タンパク質として発現されても蛍光を発することから、遺伝子発現の調節や、遺伝子産物の細胞内での局在を研究するための道具として、生物学の発展に多大な貢献をしている (Remington, 2006)。

* 宮城教育大学理科教育講座

** 宮城教育大学自然環境専攻

GFP の利用は、研究分野だけでなく教育分野においても広がり始め、教育用遺伝子組換えキットが商品化されるようになった。我が国においては、2002年1月に改訂された「組換え DNA 実験指針」において、教育目的実験の枠組みが設定され、高等学校等の教育現場でも組換え DNA 実験が可能になり、全国の高等学校で商品化されたキットを用いた実験が導入されて来ている。宮城県内の高等学校でも、菅原（2004）により先駆的な仕事が行なわれている。

教育教材とし最もよく使われているキットは、米国 Bio-Rad 社の Biotechnology Explorer pGLO Bacterial Transformation Kit (K1 pGLO バクテリア遺伝子組換えキット) である。このキットで使用されている pGLO プラスミドには、アンピシリン（抗生物質）耐性遺伝子（ β -ラクタマーゼ遺伝子）と、アラビノースオペロンの制御下に置かれた P_{BAD} プロモータでドライブされる改変 GFP 遺伝子が組み込まれている。このプラスミドで形質転換された大腸菌は、アンピシリン耐性を付与されていることから、アンピシリンにより容易にスクリーニングできること、また、L-アラビノースを培地中に添加することで始めて GFP 遺伝子が転写、翻訳されることから、遺伝子発現制御を理解できる学習プログラムに仕上げられている。pGLO プラスミドで形質転換された大腸菌のコロニーは、L-アラビノースを添加してブラックライトを当てると緑色の蛍光を発し、形質転換を目で確認できる大変優れた教育教材である。

この大腸菌により生産された組換え GFP は、大腸菌から取り出した水溶液中でも、安定した蛍光を発する。この GFP の性質を利用すれば、タンパク質を取り扱う操作を目で追うことができ、大変有用な教材になると考えられる。実際、Bio-Rad 社は、組換え GFP を大腸菌から精製するキット（K2 GFP 精製クロマトグラフィーキット）を販売している。このキットでは、大腸菌から GFP を可溶性化し、それを疎水性クロマトグラフィー用カラムで分離することが出来る。タンパク質の精製操作の一端を体験させることに主眼を置い

て、学校現場で直ぐに使えるようにキット化した商品である。残念ながら、タンパク質としての GFP の性質を十分に学習させる内容にまでは高められているとはいえない。

Ⅱ. 学習プログラムのねらい

高等学校の生物Ⅱ及び化学Ⅱで、タンパク質の分子構造について、その基本的な事柄は学習することになっている。そして、タンパク質の機能については、酵素、チャネル、ポンプ、抗体、ホルモンなどを学習する。これらタンパク質の働きがタンパク質分子の性質と表裏一体の関係になっていることを学習することが大切である。我が国の高等学校での教育では、化学と生物を合わせて学習し、生物で主に学習するタンパク質を、化学を基礎において学ばせることは困難となっている。もし、タンパク質を取り扱う実験を導入することができれば、タンパク質に関する学習内容に広がりを与え、その理解を深める効果が期待される。しかし、教育現場で、タンパク質を取り扱うとなると、1) 高価な実験装置、器具類、試薬を必要とする、2) タンパク質分子の存在を認識するために、比色定量法など新たな学習内容を加える必要がある、などの困難さがある。ここで、大腸菌による組換え GFP 利用したタンパク質の学習プログラムを開発することができれば、この2つの隘路を回避することができるものと考えた。

Ⅲ. 実験操作の検討

(1) GFP 遺伝子導入大腸菌の調整と培養

Bio-Rad 社 製「Biotechnology Explorer pGLO Bacterial Transformation Kit」を使用して、pGLO プラスミドで大腸菌（K-12：HB101）を形質転換した。形質転換大腸菌^{注1}の培養は、液体 LB（Luria-Bertani）培地^{注2}を使用した。18cm 試験管に 2ml の LB 培地を分注し、これに 0.5ml の飽和増殖期に入った大腸菌に

注1：形質転換は、Bio-Rad の取り扱い説明書に従って行った。形質転換した大腸菌は、固形 LB 培地でシングルアイソレーションを行った後、液体 LB 培地で培養後、グリセロールストックを作成し、使用まで -80°C で保存した。

注2：液体 LB 培地は、180ml の蒸留水に Bacto tryptone 2g、Bacto yeast extract 1g、NaCl 2g、1N NaOH 0.4ml を溶解し、全量を 200ml に蒸留水で調整した。オートクレーブで滅菌後、滅菌水 1ml に溶解させたアンピシリン 10mg と、濾過滅菌した L-アラビノース溶液を最終濃度が 1% になるように添加した。

培養液を添加し、1 分間に130回の往復振とうしながら、37℃で2日間培養したものを実験に用いた。

(2) 組換え GFP の可溶化

大腸菌からタンパク質を可溶化する方法として、リゾチーム・凍結融解法と、SDS (sodium dodecyl sulfate) 法を試みた。

(A) 実験方法

(a) リゾチーム・凍結融解法

リゾチームは、卵白由来リゾチーム（和光純薬）を使用した。5 mg リゾチーム粉末を 1 ml の TE (Tris/EDTA) 緩衝液^{注3}に溶解し、リゾチーム溶液を作成した。

試験管で2日間培養した大腸菌から1.5ml をマイクロチューブ (Quality #508-GRD-Q) に移し、卓上遠心機 (CAPSULEFUGE PMC-060, TOMY/6,200rpm) で5分間遠心することで集菌した。遠心後、沈殿が蛍光を発することを確認してから、上清を沈殿に触れないように注意をしながらピペットで取り除いた。沈殿の入ったマイクロチューブにリゾチーム溶液 0.3ml を加えて試験管ミキサーでよく懸濁し、更に0.3ml TE 緩衝液を加えて約2倍に希釈した後、-80℃冷凍庫に10分間入れて凍結させた。チューブを取り出して凍結した溶液を融解させ、再度5分間遠心し、上清と沈殿が蛍光を発するかを観察した。

(b) SDS 法

2日間培養した大腸菌を集菌した。上清を捨て、沈殿にTE緩衝液を1.5ml加えて再懸濁し、これに0.3mlのリゾチーム溶液を加えて37℃で10分間静置した。次に1.5mlのTE緩衝液と97.5 μ lの10% SDS水溶液を加え、再び37℃に置いた。10分後、卓上遠心機 (6,200rpm) で5分間遠心して、その上清と沈殿が蛍光を発するかどうかを観察した。

(B) 実験結果と考察

2日間培養した形質転換大腸菌を遠心して集菌

した。ブラックライトを当てると、沈殿は強い蛍光を発したが、その上清は全く光らなかった。このことは、大腸菌が発現した GFP は、大腸菌の細胞内に保持され、細胞外部には漏洩しないことを示した。

リゾチーム・凍結融解法では、-80℃で10分処理して遠心し、マイクロチューブにブラックライトを当てたところ、上清が強い蛍光を発し、沈殿は蛍光を発しなくなることを確認した。このことは、リゾチーム・凍結融解法により、大腸菌から効率良く GFP を可溶化出来ることを示した。-80℃の冷凍庫を家庭用冷蔵庫の冷凍室で代替できるかどうかを調べるために、-20℃に10分又は一晩置いた場合を検討した。-20℃に10分では表面が僅かに凍る場合もあったが、全く凍らない場合もあり、一晩置いて完全に凍結するには至らなかった。何れにしても、蛍光は上清と沈殿の両方に同程度の強度で観察された。従って、リゾチーム・凍結融解法で GFP を可溶化する場合に、-80℃による凍結が望ましいが、-20℃で10分放置することでも部分的に GFP を可溶化することが出来ることが分かった。

次に、SDS 法による GFP の可溶化を試みた。集菌した大腸菌にリゾチームと SDS をそれぞれ 37℃で10分間処理して遠心したところ、上清が強く蛍光を発するようになったが、沈殿も蛍光を発し、GFP が完全に可溶化できないことが分かった。添加するリゾチームの量を0.3mlから0.4mlに増やした場合、遠心した上清が強い蛍光を発するようになったが、遠心しても沈殿物が得られなくなった。このことは、SDSにより完全に大腸菌の構成成分が可溶化されたことを意味するものと考えられた。

(3) 硫酸（硫酸アンモニウム）分画法

一般的なタンパク質の精製操作では、目的とするタンパク質を可溶化した後、タンパク質を回収する最初的手段に、硫酸分画法が用いられる場合が多い (Scopes, 1987)。高イオン強度での操作は一般的にタンパク質を安定した状態に保てること、硫酸は安価

注3: TE緩衝液は、930mlの蒸留水に Tris6.06g、Na₂EDTA 0.37gを溶解させてHClでpH7.2に調節し、蒸留水を加えて1Lに調製した。

表1 固形硫安添加量と%飽和度の関係
25℃で試料液1リットルに加える硫安量 (g) を示す。

硫安の 初濃度 (%飽和)	硫安の最終濃度 (%飽和)									
	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
0	56	114	176	243	313	390	472	561	662	767
10		57	118	183	251	326	406	494	592	694
20			59	123	189	262	340	424	520	619
30				62	127	198	273	356	449	546
40					63	132	205	285	375	469
50						66	137	214	302	392
60							69	143	227	314
70								72	153	237
80									77	157
90										79

で溶解度の高いこと、操作が簡単な上に、大規模な抽出操作が可能であること、塩析する硫安濃度の違いを利用してタンパク質の精製が出来ることなどの利点がある。塩析は、高等学校の化学で学習する内容でもあり、高等学校での実験内容としても受け入れられるものと判断し、GFPの硫安分画法の条件検討を行った。

(A) 実験方法

大腸菌からリゾチーム・凍結融解法により可溶化した GFP 溶液（遠心後の上清）から0.5ml を新しいマイクロチューブに移したものを準備した。硫安は、和光の特級試薬（酵素精製用でもよい）を用いた。硫安は細かい結晶であるが、速やかに溶解するように乳鉢と乳棒で粉末にした。表1に従って、必要な飽和硫安濃度を得るための硫安を電子天秤で秤量し、これを直接 GFP 溶液の入ったマイクロチューブに加えて蓋を閉め、硫安を完全に溶解するまで、試験管ミキサーで攪拌した。一般的なタンパク質の取り扱いでは、溶液を泡立てないことや、低温に保つなどの注意が必要であるが、GFP の場合はそれほど神経を使わなくても変性することはなかった。硫安が完全に溶けたら、水中に1時間程度静置するのが一般的であるが、ここでは短く15分置いてから卓上遠心機で5分間遠心した。

(B) 実験結果と考察

GFP 溶液が0.5ml 入ったマイクロチューブに、30% 飽和硫安濃度になるように、硫安粉末を88mg 加えて溶解後遠心し、上清を新しいマイクロチューブに移した。これに31mg の粉末硫安を加えて完全に溶解し、40% 飽和硫安溶液にした。再び遠心して、上清と沈殿に分け、再び同様の操作で上清に粉末硫安を加えることで、80% 飽和硫安濃度に達するまで10% 刻みで硫安濃度を高め、その度毎に上清と沈殿のどちらが蛍光を発するかを記録した。表2は、50% 飽和硫安濃度まで GFP は沈殿せず、60% 飽和硫安濃度でわずかに沈殿し、80% 飽和硫安濃度で全ての GFP が沈殿することを示している。

更に詳細に GFP が塩析する硫安濃度を調べるために、8つの GFP 溶液を用意して、それぞれ20~90% 飽和硫安濃度になるように硫安を別々に加え、上清と沈殿が発する蛍光を観察した（図1）。表1と同様に50% 飽和硫安濃度では殆ど沈殿せず、60% 飽和硫安濃度で沈殿がはっきり確認でき、70% 飽和硫安濃度で更に沈殿が増えた。80、90% 飽和硫安濃度の上清では、GFP 由来の緑色の蛍光は観察されなくなった。

SDS 法により可溶化した GFP 溶液の硫安分画を試みた。30% 飽和硫安濃度では沈殿が生じず、80% 飽和硫安濃度に必要な硫安を加えた直後に、白色の固形物が多量に生じてマイクロチューブの壁面に付着した。これを15分水中に静置後、5分間遠心すると、固形物は沈殿せずに溶液の上に浮いた状態になった。これにブラックライトを当てても、蛍光を発する沈殿は得られず、浮遊物がわずかに蛍光を発するだけであった。このことは、SDS 法により可溶化した GFP 溶液を硫安分画する場合には、硫安沈殿を行う前に、可溶化された大腸菌の構成成分や SDS を除く操作を要するものと思われた。

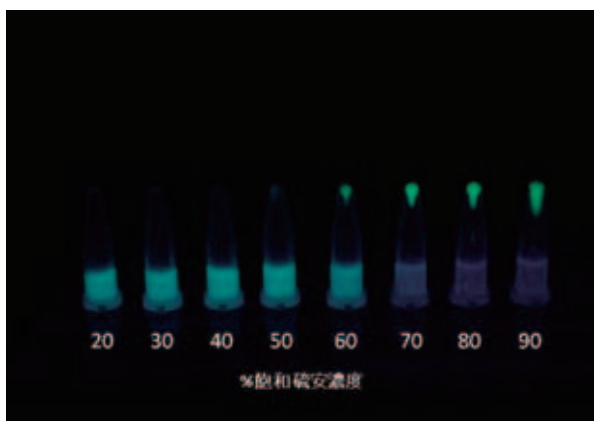
(4) 疎水性クロマトグラフィーによる GFP の分離

硫安分画後、タンパク質の精製には、それぞれの目的のタンパク質に適した種々のカラムクロマトグラフィーを組み合わせることが必要である。この時、それぞれのクロマトグラフィーの原理を知るために、タ

表2 GFPの硫酸による塩析（硫酸沈殿）

%飽和硫酸濃度	30	40	50	60	70	80
上清	+++	+++	+++	++	+	-
沈殿	-	-	-	+	+++	+++

+の数は蛍光強度の強さを表す。-は蛍光を発しないことを表す。



左から20～90%飽和硫酸濃度で処理し、沈殿を遠心によりマイクロチューブの底に集め、チューブを逆さにして撮影した。チューブの下側が上清、上側が硫酸沈殿を示す。緑色がGFPの蛍光、青白い光は自家蛍光。

図1 GFPの硫酸沈殿

ンパク質の分子としての性質を学ばなければならない。硫酸分画により得られたタンパク質は、高濃度の硫酸を含んだ溶液として回収されるため、次の精製操作に移る前に、透析や限外濾過などによる脱塩操作（イオン強度を低める）や緩衝液の交換などを行うのが普通である。この点、疎水性クロマトグラフィーは、脱塩操作を行う事なく、硫酸分画で得られたタンパク質溶液を直接分析できるため、タンパク質の精製操作で良く用いられている方法である（Scopes, 1987）。

可溶化しているタンパク質分子表面には、疎水的領域がパッチ状に広がっている。当然、それはアミノ酸の側鎖の性質が反映されているのだが、その疎水的性質は、溶けている溶液のイオン強度により大きな影響を受ける。疎水性クロマトグラフィーは、このタンパク質表面の疎水的領域と固定相となる分離用ゲル表面にある疎水性官能基との相互作用を利用して、タンパク質を分離することを原理としている。一般に、イオン強度が高まるとタンパク質の疎水的雰囲気は高まることから、疎水性クロマトグラフィー用ゲルとの結合能は増大する。従って、硫酸分画で得られた硫酸濃度

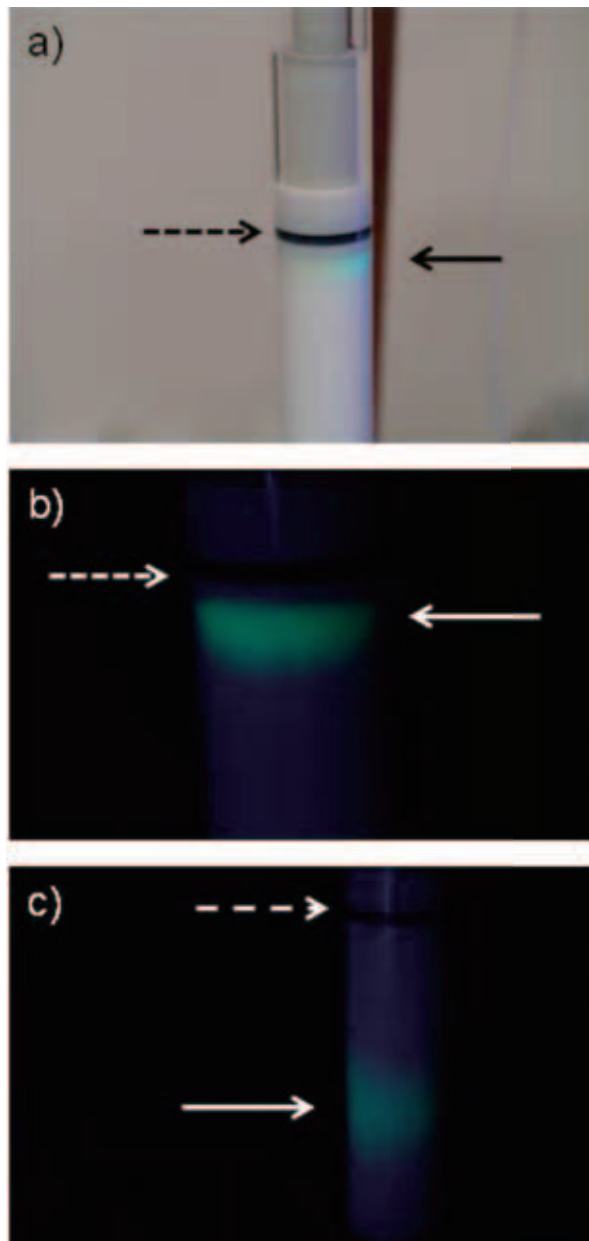
の高い溶液に可溶化しているタンパク質が疎水性ゲルと接触すると、疎水結合によりタンパク質はゲルに結合することになる。その条件で結合しなかったタンパク質は除くことができる。ゲルに結合したタンパク質は、移動相のイオン強度が低くなると、その疎水結合力に応じて、弱く結合したものから順番にカラムから溶出されることになる。このように、溶出液のイオン強度を段階的又は連続的に低下させることで、目的とするタンパク質を分離することができる。GFPを用いると、結合、解離の様子を、蛍光で追跡できることになる。Bio-Rad社の「K2 GFP 精製クロマトグラフィーキット」は、このことを行えるようにしたものである。ここでは、バルクで市販されている疎水性クロマトグラフィー用ゲルを用い、疎水性クロマトグラフィーによるGFPの分離条件を検討することにした。

(A) 実験操作法

使用した疎水性クロマトグラフィー用ゲルとして、東ソーのTSKgel Butyl-Toyopearl 650M（以降本稿では、ブチルゲルと呼ぶことにする）を用いた。GFP試料として、硫酸分画により50%～80%飽和硫酸で得られたタンパク質区分を用いた。ゲルへの結合、溶離液として、硫酸を種々の濃度で溶かしたTE緩衝液を用いた。

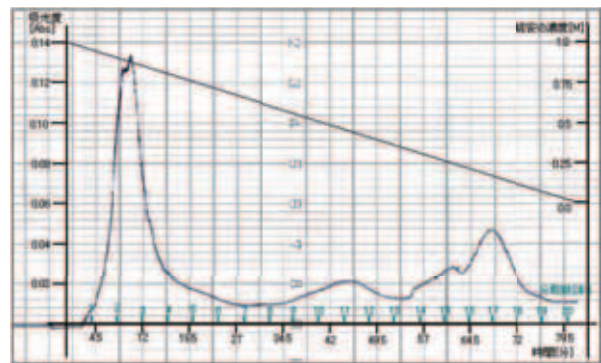
(a) バッチによる結合試験

GFPがブチルゲルに結合できる硫酸の濃度を決定するために、試験管を使ったバッチによる結合試験を行った。長さ10.5cmの8本の試験管にブチルゲルを0.5ml程度入れ、ゲルが沈んだら上清を捨て、それぞれ0.5、1.0、1.5、2.0Mの硫酸を含むTE緩衝液を1ml程度加えて懸濁させた。ゲルが沈んだ後、再び上清を捨て、それぞれ0.5、1.0、1.5、2.0M硫酸を含むTE緩衝液を1ml程度加えた。同様の操作を5回繰り返し、ゲルを平衡化した。続いて硫酸濃度が0.5、1.0、1.5、2.0MのTE緩衝液で溶解したGFP溶液を、同じ硫酸濃度で平衡化したゲルの入った試験管に加えて懸濁し、ゲルの沈殿後、上清とゲルが蛍光を発するかどうかを観察した。



a) 明所で観察したゲル上端に結合したGFP
b) 暗所で観察したゲル上端に結合したGFP
c) 硫安の直線的濃度勾配で溶出されるGFP
実線矢印はGFPを、破線矢印はカラム上端を示す。

図2 疎水性クロマトグラフィー (Butyl Toyopearl) によるGFPの分析



右縦軸は280nmの吸光度, 左縦軸は硫安濃度 (M) をしめし、横軸は硫安濃度の直線的濃度勾配による溶出開始後の時間と、分取した溶出液の試験管番号を示す。

図3 GFPのButyl Toyopearlで分析した疎水性クロマトグラム

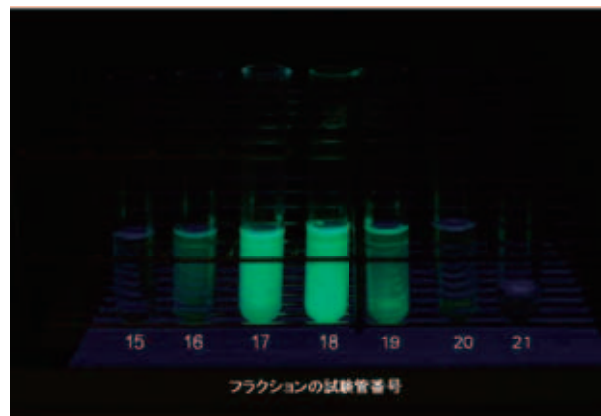
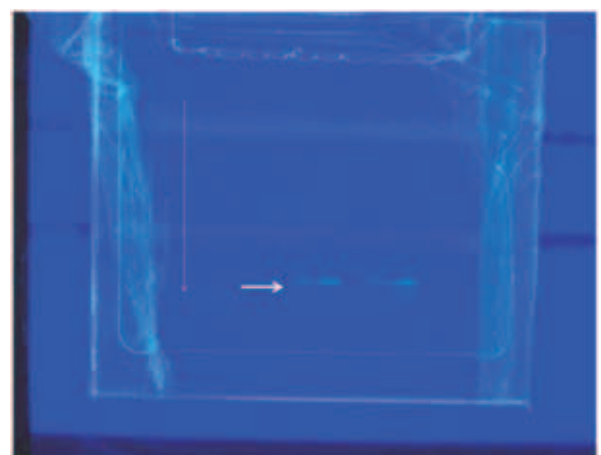


図4 疎水性クロマトグラフィー (Butyl Toyopearl) により試験管に分取されたGFPを含むフラクション



太矢印がGFPを示す。細破線は泳動方向を示す。

図5 GFPのNativePAGEによる分析

(b) 自作カラムを用いた疎水性クロマトグラフィー

1 ml用のピペットに用いる青チップ (Quality #111-Q) をカラムとして用いた。先端を 5 mm 程度カミソリで切り落とし、少量の脱脂綿を詰め、一度水で流して脱脂綿中の気泡を取り除いた。これに蒸留水で適当な濃度に懸濁したブチルゲルを加え、ゲル高さ 1 cm 程度の簡易カラムを作成した。次に 0.5 ml の 1.0 M 硫酸を含む TE 緩衝液を静かに加え、チップ先端から溶液を流し出した。この操作を 3 回行うことで、1.0 M 硫酸を含む TE 緩衝液でゲルを平衡化した。硫酸沈殿で沈殿させた GFP を、0.3 ml の 1.0 M 硫酸を含む TE 緩衝液に溶かし、これを平衡化した簡易カラムのゲルの上に静かに入れた。ブラックライトを当てて、GFP がゲルに吸着することを確認した。ここに 1.0 M 硫酸を含む TE 緩衝液硫酸を 0.5 ml を流しても、GFP が溶出しないことも確認した。続いてブラックライトを当てながら、1 ml の TE 緩衝液をカラムに加え、GFP が溶出される様子を観察した。

(c) オープンカラムを使った疎水性クロマトグラフィー

オープンカラムクロマトグラフィー装置を用いて、ブチルゲル疎水性クロマトグラフィーによる GFP の分析を行った。フローアダプターを付けた径 1.8 cm × 高さ 23.5 cm のエコノカラム (Bio-Rad 社) にブチルゲルを高さ 7 cm (ゲル体積 17.8 cm³) に充填し、1 M 硫酸を含む TE 緩衝液で平衡化した。4.5 ml の懸濁細胞から、GFP をリゾチーム・凍結融解法で可溶化し、50% - 80% 飽和硫酸溶液で沈殿したタンパク質区分を、3 ml の 1 M 硫酸を含む TE 緩衝液に溶解したものを試料とした。平衡化したブチルゲルカラムに、試料を添加後、硫酸濃度が 1.0 M から 0 M まで直線的な濃度勾配を付けた溶出液 (総量 100 ml) で溶出した。溶出溶液は、ペリスタポンプ (MITSUMI, SJ-1210) を用いて流速 1.2 ml/min で流し、280 nm の吸光度を UV モニター (Atto, Bio-Mini UV monitor, AC-5200L と Mini Recorder, SJ-3462) で記録した。溶出液は、フラクションコレクター (Pharmacia,

Fraction Collector, FRAC-100) で 4 分ごと試験管に分取した。

(B) 実験結果と考察

試験管を用いたバッチテストで、GFP は 0.5 M 以上の硫酸濃度であれば、ブチルゲルに結合することが分かった。しかし、硫酸濃度が 1.5 M を超えると、蛍光強度が弱まり、2 M では蛍光を発しなくなった。これは硫酸沈殿した GFP が、1.5 M 以上の硫酸溶液で十分溶解できないことによると考えられた。そこで、ブチルゲルを用いたカラムクロマトグラフィーでの結合には、硫酸分画で得られた GFP 区分を、1 M 硫酸を含む TE 緩衝液で溶解したものを使用することにした。

ピペットチップで作成したブチルゲルカラムで、1 M 硫酸を含む TE 緩衝液に溶解した GFP は、ゲルの上層部に結合して、ゲル上層部が帯状に蛍光を発することが確認できた。この GFP は、1.0 M 硫酸を含む TE 緩衝液を再度流しても移動することにはなかった。溶離液として TE 緩衝液を加えると、蛍光を発する GFP は、バンド状となってカラムの下へと移動し、最終的にチップ先端から光る水玉となって滴下し、これを試験管に集めることが出来た。

オープンカラムクロマトグラフィー装置を用いて GFP を分離した場合に、1 M から 0 M 硫酸の直線的濃度勾配で溶出する GFP の挙動を図 2 に、得られた 280 nm の吸光度変化で示されたクロマトグラムを図 3 に、更に、カラムから溶出された GFP を含む試料がフラクションコレクターにより分取された様子を図 4 に示す。GFP は、およそ 0.2 M から 0.05 M 硫酸濃度で溶出されることが分った。これらの実験結果は、GFP の精製に疎水性クロマトグラフィーが有効な手段であることを示した。

(5) イオン交換クロマトグラフィーによる GFP の分析

タンパク質の精製手段として良く用いられ、また、タンパク質の電気的性質を学ぶための良い学習教材になるのは、イオン交換クロマトグラフィーである。ここでは、タンパク質分子が両性イオンの性質を持って

いることを学ぶことを学習の目標とすることになる。タンパク質は、その荷電状態が溶媒の pH によって大きく変化し、丁度電氣的に中性になる pH（等電点、pI）が存在すること、pI より高い pH では陰イオンとして、また pI より低い pH では陽イオンとして振る舞うことを、イオン交換反応を通して理解することが出来る（Scope, 1987）。このような pH によるタンパク質の性質の変化を実験することで、何故タンパク質を取り扱う場合に、緩衝液を使って pH を一定に保つ必要があるのかを認識できるようになるものと期待される。

(A) 実験操作

イオン交換樹脂としては、陰イオン交換体として DEAE Sephacel 又は DEAE Sepharose（Pharmacia Biotech）を使用した。本稿では、以降これらを DEAE ゲルと呼ぶことにする。まず、DEAE ゲルへの GFP の結合条件を調べるために、試験管によるバッチテストを行った。使用した緩衝液は、pH9.0、8.0は10mMBicine 緩衝液、pH7.0、6.0は10mMMES 緩衝液、pH5.0、4.0は10mM 酢酸緩衝液を使用した。次に、チップで自作したカラムを使用して、GFP の DEAE ゲルによる分離を試みた。

(a) バッチによる結合実験

DEAE ゲルに GFP が結合する pH を決定するために、試験管を使ったバッチによる GFP 結合実験を行った。長さ10.5cm の試験管に、DEAE ゲルを0.5ml 程度入れ、ゲルが沈殿したら上清を捨て、使用する pH の緩衝液を 1 ml 入れて攪拌後、ゲルが沈殿したら上清をすてる操作を 5 回繰り返し、ゲルを平衡化した。各 pH の0.5ml 緩衝液を含む平衡化した DEAE ゲルに、ブチルゲルから溶出した GFP 溶液を50 μ l ずつ加えて攪拌し、静置した。ブラックライトを当て、沈殿した DEAE ゲルと上清の蛍光を観測した。

(b) 自作カラムを用いたイオン交換クロマトグラフィ

ブチルゲルと同様にして作った自作カラムに、DEAE ゲルを高さ 1 cm 程度詰め、pH5.0 の10mM 酢酸緩衝液を0.5ml ずつ 3 回流して平

衡化した。ブチルゲルから溶出した GFP 溶液の50 μ l を DEAE ゲルに静かに載せ、GFP がゲルに吸着することを蛍光で確認した。その後 pH4.0の10mM 酢酸緩衝液を 1 ml 添加し、GFP を溶出させた。この間、GFP の挙動を室内を暗くしてブラックライトを当てながら観察した。

(B) 実験結果と考察

DEAE ゲルに GFP が結合する pH を、試験管によるバッチテストで調べた。表 3 では種々の緩衝液で作った pH9.0から4.0の範囲での結果を、表 4 では、10mM 酢酸緩衝液で pH4.9から4.1までの狭い範囲での結果を示した。

表 3 から、GFP は pH 5 から 4 の間で DEAE ゲルに結合できなくなることが分かる。表 4 の結果から、pH4.9～4.7では DEAE ゲルに結合できるが、pH4.5から4.4の間では DEAE ゲルへの結合力が弱まり、pH4.3ではもはや DEAE ゲルに結合出来ないことが分かる。このことは、GFP の等電点は pH4.5から4.4の間にあることが示唆した。一方、pH が4.1以下になると GFP の蛍光強度が徐々に弱くなった。このことは、GFP は pH 4 以下になると変性し、蛍光を出す活性を失う可能性が考えられた。そこで、pH5.0、4.0、3.0の緩衝液を50mM クエン酸水溶液と100mM リン酸二水素ナトリウム水溶液を混合して作成し、これに GFP 溶液を加え、ブラックライトを当て蛍光を観察した。

表 3 pH9.0から4.0の広い範囲で調べて GFP の DEAE ゲルへの結合活性

pH	9.0	8.0	7.0	6.0	5.0	4.0
上清	—	—	—	—	—	+
ゲル	+	+	+	+	+	—

pH9.0と8.0は10mMBicine 緩衝液、pH7.0と6.0は10mMMES 緩衝液、pH5.0と4.0は10mM 酢酸緩衝液を使用、+：蛍光あり、—：蛍光なし

表 4 pH4.9～4.1の10mM 酢酸緩衝液での調べた GFP の DEAE ゲルへの結合活性

pH	4.9	4.8	4.7	4.6	4.5	4.4	4.3	4.2	4.1
上清	—	—	—	—	+	+	+	++	+
ゲル	++	++	++	+	+	+	—	—	—

++：強い蛍光、+：弱い蛍光、—：蛍光なし

pH5.0の場合は、強い蛍光が観察されたが、pH4.0では、徐々に蛍光が弱まっていき、間もなく蛍光が観測できなくなった。更に、pH3.0の緩衝液に GFP を加えると直ちに蛍光が消え、GFP は pH4.0 以下で変性することが明らかになった。

pH5.0の10mM 酢酸緩衝液で平衡化した DEAE ゲルカラムに、GFP 溶液を加えたところ、DEAE ゲルに吸着せず溶出する GFP がみられたが、やがてゲル全体が弱く蛍光を発し、GFP が吸着されたことが分かった。この結合した GFP は、pH4.0の10mM 酢酸緩衝液でカラムから溶出できた。これらの実験結果は、ブチルゲルから溶出した GFP 溶液には硫酸が含まれており、イオン強度が高いことが DEAE ゲルへの GFP の結合を妨げていることを示すと考えられた。DEAE カラムに GFP を完全に吸着させるためには、ブチルゲルから溶出された GFP 溶液を、一度脱塩する必要があったと考えられた。

(6) 電気泳動法

タンパク質の電気泳動法による分析は、その目的に応じて様々な手法がある。ポリアクリルアミドゲルによる電気泳動法（PAGE）が一般的である。タンパク質をその大きさと分離する方法として、SDS-PAGE は最も多用されている技法である。この場合、タンパク質が変性し、その機能が損なわれる場合もある。それに対して、主にタンパク質の形状と荷電状態の違いから分析する方法として native PAGE がある。ここでは、GFP の native PAGE を試みる事にした。

(A) 実験手法

(a) GFP サンプルの調製

電気泳動用の試料として、硫酸沈殿で得られた GFP を使用するために、GFP 溶液の脱塩操作を行った。脱塩には MICRODIALYZER SYSTEM 100 (PIERCE) と、透析膜 (size24/32、三光純薬) を用いた。硫酸沈殿で回収した GFP を、10mM Tris-HCl (pH6.8) 緩衝液に溶解し、これを 10mM Tris-HCl (pH6.8) 緩衝液に対して透析した。透析は、GFP を 20 μ l ずつウェルに入れ、4℃の冷蔵庫内でスターラーで攪拌しながら、30分毎に、10mM Tris-HCl

(pH6.8) 緩衝液を交換する操作を 3 回繰り返して脱塩した。脱塩試料に、青色色素 BPB (ブロモフェノールブルー) と 5% グリセロールを少量加えて泳動用 GFP サンプルとした。

(b) 泳動用試薬の調製

電気泳動試薬の調整とポリアクリルアミドゲルの作成は、Hames (1981) の方法に従った。分離用ゲル緩衝液は 3.0M Tris-HCl 緩衝液 (pH8.8)、スタッキングゲル緩衝液は 0.5M Tris-HCl 緩衝液 (pH6.8)、そして泳動用緩衝液は Tris/グリシン緩衝液 (pH8.3) を用いた。ミニゲル (90 \times 80 \times 1 mm) は、acrylamide-methylene-bis (acrylamide) (30:0.8) 液を用いて作成し、分離用ゲル濃度は 7.5%、スタッキングゲル濃度は 3.7% とした。スタッキングゲル作成の触媒には、試料タンパク質の変性を避ける目的で、ammonium persulphate の代わりに riboflavin を用いた。泳動槽は、ATTO の MODEL AE-6440 を、定電圧装置は ATTO の MODEL AE-8250 を使用した。GFP 試料を 5 μ l 又は 10 μ l 使用し、15mA 定電流で泳動した。途中、数回にわたりブラックライトを当てて GFP を蛍光させ、泳動中の GFP バンドの動きを観察した。

(B) 実験結果と考察

泳動を開始後、ブラックライトを当てると GFP は広がらず、ウェルの幅のままバンド状に流れているのが確認できた。1 時間程すると BPB が GFP を追い越し、徐々にその差は広がっていった。BPB がゲルの下部に到達した時点で泳動を終了し、取り出したゲルを写真撮影した (図 5)。蛍光を発するバンドが確認でき、GFP を使用することで、電気泳動されるタンパク質の動きを観察できることが明らかになった。

IV. 教育実践

ここで紹介した、GFP を利用したタンパク質に関する実験プログラムを、現在まで高等学校、大学、教員研修で実践することを試みてきた。

(1) 宮城県立宮城野高等学校での実践例

宮城県宮城野高等学校で、平成19年12月10・11日の2日間、1日目は50分+昼休み15分、2日目は50分の授業時間を頂き、総合学科3年生の理系生物Ⅱ選択履修者16名を対象にGFPの抽出から精製まで、2時間連続した実験を実践した。実験は3～4人の班単位で行わせ、終了後にアンケートを実施した(知識, 2007)。

(A) 学習指導案

授業日：平成19年12月10・11日

実験名：組換えGFPの抽出および精製実験

ねらい：遺伝子組換え大腸菌から目的のタンパク質、GFP (Green Fluorescent Protein) を抽出し、疎水性クロマトグラフィーとイオン交換クロマトグラフィーの2種類のカラムクロマトグラフィーを利用して精製することにより、タンパク質の一般的な抽出・精製法を学ぶとともに、タンパク質の化学的な性質に関する理解を深める。

指導計画：

第1日目：12月10日(月) 4校時 11:55～
12:45 (50分)
昼休み12:45～12:55 (10分)

導入(3分)：

1. 実験内容の説明

遺伝子組換え大腸菌からGFPの抽出と精製を行う。

2. 遺伝子組換え実験に関する諸注意

展開(54分)：

3. GFPの抽出

3. 1 集菌

培養液1.5mlをピペットでマイクロチューブに移し、2分間遠心する。

上清－液体のLB培地…×(光らない)

沈殿－大腸菌…○(光る)

3. 2 大腸菌の破壊

上清をピペットで取り除き、沈殿にTE緩衝液300μlとリゾチーム300μlを加え、ボルテックスでよく攪拌し、-20℃の冷凍庫で10分間静置する。

*リゾチーム－細胞壁を加水分解し、細胞を弱める。

*冷凍庫－凍結・融解により細胞が壊れる。

冷凍庫から取り出して溶解した後、2分間遠心する。

上清－溶出したGFPを含む溶液…○

沈殿－壊れた細胞片…×

3. 3 硫酸沈殿

上清500μlを新しいチューブにとり、粉末の硫酸を80%飽和濃度になるように入れて懸濁する。

水中に10分静置した後2分遠心する。

上清－緩衝液など…×

沈殿－GFPを含む大腸菌の色々なタンパク質…○

3. 4 1M硫酸溶液に溶解する。

上清を捨て沈殿を1M硫酸300μlに溶かし、冷蔵庫に入れて翌日まで保管する。

まとめ：

4. 菌体の破壊やタンパク質の抽出法についての確認

5. 次回の実験の簡単な説明

第2日目：12月11日(火) 5校時8:55～
9:45 (50分)

導入(3分)：

1. 前回の実験の復習

菌体を破壊してGFPを可溶化し、硫酸により塩析した。

2. 実験内容の説明

今回は2つのクロマトグラフィーでタンパク質を精製し、GFPの純度を上げる。

展開(37分)：

3. GFPの精製

3. 1 カラムの平衡化

BUTYL TOYOPEARL → 1M硫酸
DEAE-Sephacel → pH5.0酢酸緩衝液
でそれぞれ0.5ml × 3回流して平衡化する。

3. 2 GFPの結合と溶出

1) ブチルゲルカラムに1M硫酸に溶解したGFPを添加する。→ゲルの上層にGFPが結合して蛍光を出す。

2) TE緩衝液を流しGFPをゲルから溶出させる。

3) 最初の透明な溶液を試験管に集め、光っている溶液が出てきたら数滴試験管に回収し、これを DEAE カラムに添加する。GFP が DEAE に吸着されることを確認する。

4) pH4.0酢酸緩衝液で、GFPを溶出する。

4. クロマトグラフィーの解説

4. 1 疎水性クロマトグラフィー

4. 2 イオン交換クロマトグラフィー

まとめ：

5. 2 日間の実験の解説とまとめ

5. 1 リゾチームと凍結による抽出について

5. 2 疎水性／イオン交換クロマトグラフィーによる精製について

6. アンケートの実施

(B) アンケートの結果

アンケートは四段階評価と自由記述により行い、四段階評価は次のように設定した。

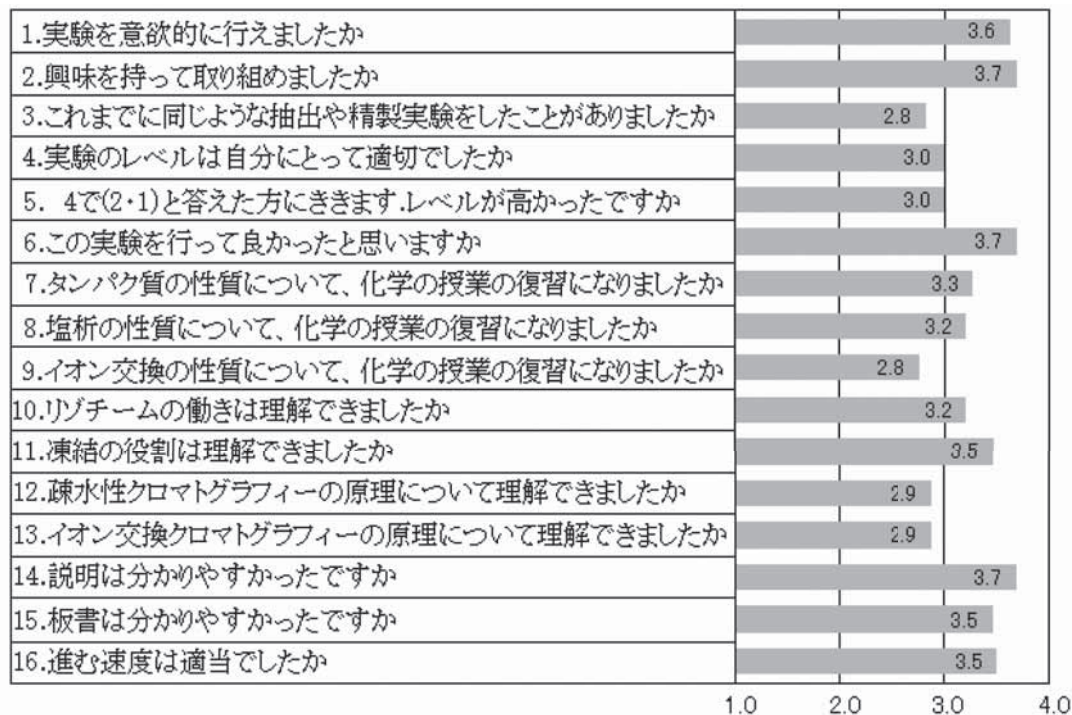
(a) 授業内容の評価

授業内容について、16問の質問をすること

で、受講者から受けた4段階での評価を図6に示す。

(b) 自由記述（全体を通しての感想）

イオン交換クロマトグラフィーをしていたときに、GFP のバンドが目にはちゃんと見ることができたのでおもしろかった／途中で蛍光が消えてしまったのは残念でしたが、それをもとにカラムの中で何が起ったか、原因は何かなど様々な方向から考える元になったので興味深く、とても面白かったです／実験の手順や説明が分かりやすかった／原理を理解しつつ楽しく実験をすることができました／抽出実験は以前したことがあったのですが、今回はそれよりも詳しくて応用的な実験だったので、より理解を深めることができました。また、この実験で忘れていたことを思い出すことができたのでよかったです／菌の破碎が不十分だったせいか少ししか光らなかったり、pH が不適だったのか最後に失敗してしまったけど、実験の難しさや楽しさを感じることができました／次に何をすればいいのか、という疑問は生まれなかったのですが、自分の頭の悪さのため、何のためにそ



はい（4点）、どちらかと言えば、はい（3点）、どちらかと言えば、いいえ（3点）、そしていいえ（1点）の4段階評価

図6 宮城野高校での授業評価

の動作をしているのかを知りつつ実験を行えなくて残念でした／ペーパークロマトグラフィーしかしたことがなかったので疎水性クロマトグラフィーやイオン交換クロマトグラフィーは初めてだったから、きちんとできているのか心配だったが、光ったのでよかった。原理も何となくわかった／遺伝子を大腸菌に導入して有用なタンパク質をつくらせ増やしたものを抽出する今回の実験はおもしろかったです。失敗してしまいましたが、全てカラムから出てしまった抽出液にいろいろとアドバイスを受けて操作を行い、再回収してカラムに戻し最後に $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$ を入れると GFP がカラムから溶出しました。失敗してしまっても、理論的に考えて操作すれば材料を無駄にしなくて済むことが分かりました。／少し難しかったけど、おもしろかった。GFP が消えてしまったのは残念だった／実験は失敗に終わってしまったが、今までにやったことがなかった方法で実験できともおもしろかった。また、試薬などが分かりやすく表示されて置かれていたので、とまどうことが少なくて実験しやすかったと思う／操作を進めるにつれて、次第に蛍光色が明るくなっていったので、GFP が精製されているということが分かった／最後は蛍光色が消えてしまい、純粋な GFP を取り出すことができず残念だった。pH をもう少し大きくしたら GFP を取り出すことができたのかということも実験できればよかった／イオン交換クロマトグラフィーの際に GFP がスッと突然消えたのには落胆しました。悔しいです。でもいろいろな原因も考えることができたのでおもしろかったです／今回の実験で失敗した時、宮教の先生が「もう 1 回やってみよう」と言ってくれもう一度やってみたところ、わずかにカラムから溶出しているところが見られたので「実験の楽しさ・おもしろさ」がとても実感できました。実験をやるときは、その操作も大切だけど、自分から積極的に行うことも大事だということを学ばせてもらいました／最初は難しそうに思っていたが、やっていくうちに少しずつ何をやっているのかが分かってくると楽しくなった。蛍光に発色するのを光を

あてながら操作する実験は初めてのことであったので非常に興味深かった。

(C) 今後の課題

四段階評価では、最低でも 2.8、最高では 3.7 と全体的に高い評価を得ることができた。項目別に見ると、初めの「実験を意欲的に行えたか」、「興味を持って取り組めたか」と 6 番目の「この実験を行って良かったと思うか」のポイントが高かった。原理については、タンパク質の抽出におけるリゾチームと凍結の役割を、ほとんどの生徒が理解してくれたようである。一方、クロマトグラフィーに関しては、実験時間内にきちんと解説できず、理解度は十分なものではなかったようである。しかし、実験全体を通しての説明、板書の仕方、そして進捗については肯定的な回答が多く、適切であったものと判断した。

GFP の抽出においては、ピペットの操作に慣れもらうのに時間を要した。その結果、大腸菌を冷凍庫へ 10 分間入れる予定を 8 分間に短縮したため、凍結までは至らず、GFP の抽出効率が低下した。GFP 量が少ないと蛍光強度が弱くなり、その後の実験結果に大きな影響を与えることが分かった。高等学校では、 -80°C の冷凍庫を保有することは難しいため、これをどのように克服するかは一つの問題となった。GFP の抽出法として、SDS 法も検討しているが、この方法を採用するためには、抽出後透析など新たな操作を入れる必要があると考えられる。予め GFP を抽出したものを別に準備し、対応することが必要かもしれない。

硫酸沈殿によるタンパク質の塩析や、ブチルゲルを使用した疎水性クロマトグラフィーについては、実験そのものに大きな問題点はない。但し、疎水性クロマトグラフィーの原理については、高等学校の教育レベルを超えていることがアンケート調査にも現れている。

イオン交換クロマトグラフィーについては、ブチルゲル疎水性クロマトグラフィーで溶出された GFP 区分に含まれる硫酸が高く、これを直接 DEAE ゲルに載せた場合、GFP が DEAE

ゲルに保持されずに素通りする場合が見られる。DEAE ゲルに載せる前に、本来は脱塩操作をすべきであるが、簡便な方法としては、硫酸濃度を低めるために10mM 酢酸緩衝液希釈する必要があるであろう。また、溶出に pH4.0 の緩衝液を使用することは、GFP の変性を引き起こす危険があるため、溶出溶液としては 100mM NaCl を加えた pH5.0 の 10mM 酢酸緩衝液を用いるべきものと思われる。

(2) その他での実践

平成19年度におけるコロンビアの教員研修と宮城野高等学校の実践を参考して、若干の変更を加えて、平成21年度、宮城教育大学教育学部中等教育教員養成課程3年生の生物実験Ⅱ、及び宮城第一高等学校で、次のようなプロトコルで実験を行った。

実験課題：組換え GFP (Green Fluorescence Protein) の抽出と精製

GFP とは、オワンクラゲ (*Aequorea victoria*) の緑色発光たんぱく質である。このたんぱく質は紫外線を当てることで、緑色の蛍光を発することから、目的とする遺伝子に GFP 遺伝子を繋げたものを作り、これを生体内で発現させることで、その遺伝子の発現量や発現場所などを知るなどの解析を行うための道具として、近年盛んに使用されている。GFP は大変安定したタンパク質で、室温で取り扱っても蛍光を発する活性が失われず、紫外線を照射することでその存在が容易に確認できる。この利点を生かして、GFP を大量に生産する大腸菌 (GFP 遺伝子を導入したプラスミド (pGLO) で形質転換した大腸菌) からその GFP を抽出し、これを使ったタンパク質の基本的精製技術と、その原理について学ぶことにする。

実験手順

- 1) pGLO 形質転換大腸菌 (LB 培地、37℃、2 日間振とう培養) の集菌
パスツールピペットで培養液をプラスチックチューブに全量 (1.5ml) 移す。
ブラックライトで溶液が光ることを確認。
- 2) 5,000 rpm で 5 分間遠心し、大腸菌をチューブの下に集める。

ブラックライトで沈殿が光ることを確認。

上清をパスツールピペットで元の培養試験管に戻す。

- 3) 500 μ l リゾチーム溶液 (卵白由来リゾチーム、和光純薬、5mg/1ml TE buffer) を入れ、ミキサーでよく攪拌後、500 μ l TE を加え、-80℃ に 10 分間入れ、凍結する。
- 4) 凍結した大腸菌を融解後、5,000rpm で 5 分間遠心する。

ブラックライトで上清が光ることを確認。

- 5) 500 μ l 上清をピペットで新しいチューブに移し、これに 156mg の硫酸を入れ、蓋をしてからミキサーで良く攪拌してから、氷中に 10 分間おく。
- 6) 5,000rpm で 5 分遠心する。

ブラックライトで上清が光ることを確認。

この結果、GFP が 50% 飽和硫酸で沈殿 (塩析) しないことを確認する。

- 7) 上清をなるべく全量新しいチューブにピペットで移し、これに 107mg 硫酸を入れ、蓋をしてからミキサーで良く攪拌し、硫酸を完全に溶かし、その後水中に 15 分間おく。
- 8) 疎水性クロマトグラフィー用ゲルカラムの準備
 - A) ミニカラムに蒸留水をいれ、ここにブチルトーヨーパール (TOSOH) のゲルを駒込ピペットで入れ、高さ 1.5cm 程度になるように詰める。
 - B) その上から静かに 0.5ml の 1 M 硫酸水溶液を入れ、ミニカラムの先端からポタポタと液を落とし、ゲルの上に溶液がなくなったら再び 0.5ml の 1 M 硫酸水溶液を入れ、同様の操作を全部で 3 回繰り返す (ゲルの平衡化)。

- 9) 氷中の 15 分置いた 80% 硫酸の GFP 溶液を、5,000rpm で 5 分間遠心する。

ブラックライトで沈殿が光ることを確認。

この結果、GFP が 80% 飽和硫酸で沈殿 (塩析) したことを確認する。

- 10) 上清を取り除いた後、ここに 0.5ml の 1 M 硫酸水溶液をいれ、ミキサーで攪拌し、GFP を再び溶かす。

ここからは、ブラックライトの下で操作を行う。

- 11) 8) で調整した疎水性クロマトグラフィーカラムに試験管を当て、ゲルの上にゆっくりと 10) で調

整した0.5mlの1M 硫酸 GFP 溶液を添加する。完全に溶液が流れ出たら、ゲルの表面が光ることを確認する。

- 12) 次に、カラムに別の試験管を当て、カラムの上部から1mlのTE溶液をゲルの上にゆっくり載せ、ゲル上層で光っていたGFPが徐々に下に流れ落ちることを観察する。光った部分がカラム先端にまで辿りつく直前に、下に当てた試験管を外し、別の1.5ml 遠心チューブにカラムから溶出してくる光った溶液を回収する。この溶液には、TE溶液（硫酸を僅かに含む）にGFPが溶解していることになる。この操作により、タンパク質の精製と脱塩操作を同時に行ったことになる。
- 13) イオン交換クロマトグラフィー用ゲルカラム
 - A) ミニカラムに、DEAEトローパー（東ソー）のゲルをピペットで入れ、高さ1.5cm程度詰める。
 - B) その上から静かに0.5mlの10mM 酢酸緩衝液（pH5.0）を入れ、ミニカラムの先端からポタポタと液を落とし、ゲルの上に溶液がなくなったら再び0.5mlの10mM 酢酸緩衝液（pH5.0）を入れ、同様の操作を全部で4回繰り返す（ゲルの平衡化）
- 14) 次に、回収したGFP溶液を10mM 酢酸緩衝液（pH5.0）で3倍に希釈し、これを13)で調整したイオン交換クロマトグラフィー用ゲルカラムに流し込む。
- 13) イオン交換クロマトグラフィーカラムゲルの上端が光ることを確認する。
- 14) 次に、100mM NaClを含む10mM 酢酸緩衝液（pH5.0）をカラムに加える。光った部分が下に移動し始めて、やがてカラム先端から溶出される様子を観察する。

謝 辞

GFPを使ったタンパク質の実験プログラムを開発する上で、実践の場を提供頂くなどの援助を頂いた、宮城県第二女子高等学校菅原賢一教諭、宮城県宮城野高校角田千恵教諭、宮城県宮城第一高等学校小松原幸弘教諭に感謝の意を表します。

文 献

- 知識麻友子（2007）組換えGFPを利用したタンパク質分析学習システムの構築 宮城教育大学教育学部生涯教育総合課程自然環境コース自然環境専攻、卒業論文
- Hames B. D. (1981) An Introduction to polyacrylamide gel electrophoresis. In Hames B. D. and Rickwood eds., Gel electrophoresis of proteins, a practical approach. Oxford, IRL Press, 1-91
- Heim R., Prasher D. C. and Tsien Y. R. (1994) Wavelength mutations and posttranslational autooxidation of green fluorescent protein. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 91: 12501-12504.
- Remington S. J. (2006) Fluorescent proteins: maturation, photochemistry and photophysics. Current Opinion in Structural Biology 16:714-721.
- Scopes R. K. (1987) Protein purification principles and practice, New York, Springer-Verlag
- 菅原 賢一（2007）高等学校における遺伝子関連実験プログラムの開発 宮城教育大学大学院教育学研究科（修士課程）教科教育専攻・理科教育専修修士論文

（平成21年9月30日受理）