



日本電気泳動学会

# Newsletter

No. 7 OCTOBER 15, 2013

発行者 日本電気泳動学会 〒755-8505 山口県宇部市南小串1-1-1 山口大学医学系研究科プロテオーム・蛋白機能制御学内 Tel: 0836-22-2213 URL: <http://www.jes1950.jp/>

## 会長挨拶



日本電気泳動学会会長 前川 真人 (浜松医科大学臨床検査医学)

今年の夏は異常に暑く、各地で最高気温が更新されました。また、雨は局地的に大量に降り、一方では水不足で節水となっています。南方の海は水温が高く、今後は巨大な台風が日本に近いところで発生して上陸する恐れもあると言われています。まさに異常気象です。会員の皆様、夏ばてしていませんか。季節は処暑も過ぎ、このニュースが発刊する頃はさすがに涼しくなっていることを願っています。

先のニュースでも書きましたが、電気泳動技術は成熟しており、なおも新しい周辺技術が進歩しています。それゆえに、成熟した技術を扱う電気泳動学会は今の日本のようにマイナス成長で老化が進んでいます。その日本丸の舵取りには、歴代の首相が四苦八苦しているように、規模は全く異なりますが、電気泳動学会の運営も難しいところですが、ただ、成熟社会であっても、日本の歴史の深さ、日本の国民性は諸外国から尊敬され、日本発の新旧の文化

や技術も海外で絶賛されているものがたくさんあります。あの(という大変かもしれませんが)きゃりーぱみゅぱみゅも海外遠征して人気を博しています。日本のアニメ、ゲームはもちろんのこと、初音ミクも世界を席卷しています。電気泳動学会も是非、各人の特徴を活かしてとんがっていただければと思います。

さて、今年の電気泳動学会総会は11月15、16日に仙台で船渡忠男教授を総会長として開催されます。基礎と臨床との連携、臨床検査としての電気泳動、電気泳動技術というキーワードがちりばめられています。暑くもなく寒くもなく、紅葉も美しい(期待もこめて)良い時期だと思います。秋の骨休みも兼ねて、新しい知見、新しい技術、新しい親交をゲットしていただけるよう、積極的に参加していただければ幸いです。仙台で皆様とお会いできますことを心から願っております。

## 第63回日本電気泳動学会シンポジウム報告

農業生物資源研究所 農業生物先端ゲノム研究センター

梶原 英之



平成25年6月21日(金)、第63回日本電気泳動学会シンポジウム(農業生物資源研究所共催)を日東紡ビル4階ホール(東京)にて開催しました。これまでのシンポジウムとは異なり、「電気泳動と質量分析による微生物の分析」というテーマで行いました。会場定員以上の事前申込があり、2週間前には参加申込をお断りすることになりました。約130名の参加者のうち、企業研究所関係者が半数以上を占めた点もこれまでとは違っていたと思います。

まず、農業生物資源研究所理事および日本電気泳動学会会長の挨拶後、最近開発したMS-CAPS法の紹介とともに本会の開催の狙いを世話人より述べました。土壌中の難培養性微生物を分析でき、土壌診断に活用できるPCR-DGGE法の紹介の後、2D-DIGEを駆使した微生物の分析についての報告がありました。臨床および食品産業で注目され、微生物のコロニーを質量分析することによって種を同定するMALDI-biotyping法を3名の演者によって基礎から実際例まで分担して講演しました。最後にキャピラリー電気泳動による微生物の分離法の紹介とその展望を述べました。また、GEとブルカーダルトニクスから最新技術の紹介がありました。各講演者の詳しい内容については

電気泳動学会ホームページに講演要旨集がありますので御参照いただければと思います。

最後になりましたが、本会を開催するにあたり、快く御援助下さったGE、ブルカーダルトニクス、ファスマック、および理科研に感謝申し上げます。



▲シンポジウム会場の様子

## 親和電気泳動法による免疫反応の解析 New York の Kabat 教室での 70 日

竹尾 和典

日本電気泳動学会名誉会員

1977年、親和電気泳動法（以後AEPと略す）を免疫反応の解析に利用したいと考え、そのモデルとしてNew York Columbia大学微生物学教室のElvin A. Kabat教授に、教授の作成されたマウス抗デキストラン・ミエローマ蛋白とデキストランとの反応をAEPによって解析したいと、お願いしたところ、折返し快諾の返事を頂き、文部省短期研修助成を得て、1978年3月20日、New YorkのKabat教授の研究室を尋ねました。

私はその時までKabat先生とは面識はなく、先生の業績は先生の著者：Structural Concepts of Immunology and Immunochemistry（第2版：1976；H.P.W. 出版）によって得たものです。その著書の224頁には電気泳動法の創始者A. Tiselius先生との共同研究（J Exp Med. 1939;69:119-131）が精解されています。この共著論文は血漿蛋白中の $\gamma$ -グロブリン分画はその大部分が免疫蛋白によって占められている事を初めて明らかにした論文です。Kabat先生はNew Yorkで医学を学ばれた後、1937年から1年余Uppsala大学のTiselius教室に留学されておられます。上記の論文はその際に発表されたものです。免疫反応の解明を生涯の研究テーマとされたのはTiselius教室における血漿 $\gamma$ -グロブリンの研究がその出発点であったと推察しています。先生は世紀の変わる2000年にお亡くなりになりました。60年余の間、一貫して免疫反応の解明に尽力された先生の偉業を称え、ご冥福をお祈りいたします。

本題に戻ります。1978年3月20日、New Yorkに到着。翌21日Kabat先生に挨拶。直ちに実験計画の打合せに入りました。2種類のマウス・ミエローマ蛋白、各種デキストラ標品、糖鎖数の異なるイソマルトース・オリゴマーを受け取り、泳動の準備です。3日後には、AEPの実験に入る準備は整いました。

当時、Kabat先生はNIHにも研究室を持っておられ、New Yorkには週3日来られ、午前8時には教授室に入っておられました。私のいる実験室によく来られAEPの操作を注意深く見ておられ、実技操作についてのコメントを頂くこともありました。私のNew York滞在は先生と机を並べて仕事をした70日であったと実感しています。

実験は効率よく進み、5月中旬には先生に論文の粗稿をお渡しすることができました。ただ、デキストラン試料の一つに算出した結合定数の値が低いものがあり、その理由を説明でき

ず、粗稿には生のデータをそのまま示すに留めました。6月1日にNew Yorkを発ってMünchen郊外にあるMax-Planck研究所にK. Hannig教授を訪ねましたが、丁度その時、New YorkのKabat先生から電話がかかり、前述の問題の試料はデキストランではなくフラクタンであった。大変失礼した。この試料についての記述はすべて削除して、J. Immunologyの編集部に送り、本日受理された。今年中には出版される予定である（J Immunol. 1978;121:2305-2310）、との連絡を受けました。このフラクタンに関する事項はAEPの信頼性を高める結果となったと考えています。

Kabat先生に論文の粗稿をお渡しした時、竹尾はもう一編論文を書く積りのようだと思われておられましたが、宇部を発つ直前の教授会で医学部の次期学生部委員に選出され、事情を説明して、委員着任の一期延期を申し入れましたが受け入れられず、帰国の日程を変えることは不可能ですと弁明しましたが、先生は「日本はexcuseの自由のない国ですか」と残念そうでした。

New York 70日滞在は短いものでありましたが、充実した毎日でした。AEPの発展にも貢献できたと考えています。私の遠い思い出の一つでもあります。



自筆の絵画「新緑の奥入瀬溪流」の脇に立たれる竹尾和典先生。  
Cubeグループ展にて（宇部市：2013年4月26-29日）。

## 手作り電気泳動

鈴木 潤・坂口 和子

麻布大学 生命・環境科学部 食品生命科学科 食品生化学研究室

電気泳動マエストロ(名人)と言うと真っ先に思い浮かぶのは、今年の2月に御逝去された恩師故小林貞男先生(麻布大学名誉教授)である。先生とは学部昇格の準備が進められていた昭和49年に麻布公衆衛生短期大学に助手として呼んで頂いたのが、本格的なお付き合いのスタートとなった。以来39星霜、なにかとご迷惑をお掛けしながら公私にわたりご指導を戴いた。先生は手先が器用であり、調製用等電点電気泳動用のガラス製ゲル板は大小様々よく作って戴いた。厚いガラス板は加工が難しいといわれながらも、依頼した翌日には必ず出来ており、何時作られたのかと不思議に思ったことも度々であった。また、学部昇格後の実験器具類の中で、各種電気泳動装置は先生の手作りの作品が多い。種類はでんぶん電気泳動、セルロースアセテート膜電気泳動、ポリアクリルアミドゲルdisc電気泳動および等電点電気泳動等である。学生数は90名近くになるので各種装置も最低8台程度は必要になるが、これらは手作りであった。

一方、先生の指導により開始した研究は「A群レンサ球菌の産生するストレプトリジンOの性状解析」であった。対象となる溶血毒素、ストレプトリジンO(SLO)は*Streptococcus pyogenes*により産生される細胞膜破壊能を有するタンパク毒素であり、溶血活性の他にも心臓毒性や致死毒性も示すことが知られている。SLOの精製とその性状解析については古くから多くの研究が行われてきたが、産生量がわずかであることや不安定のために、その分子量や等電点などの基礎的な物理化学的性質についても意見の一致は見られておらず、また生物学的な性質である溶血活性のメカニズム、加えて感染症における毒素の役割は十分には解明されていなかった。これらの未解決の問題を明らかにする第一段階として、等電点分析法の検討を行なった。当時、タンパク質の一次元における分析技術で、最も勝れた方法が等電点電気泳動(IEF)であったが、本法の主流はカラムIEFであった。カラム法の分離能は勝れていたが、タンパク質を泳動後に分取する際に再混合が生じやすいという欠点を抱えていた。そのため支持体を用いた平板型IEFに切り替え、分離能を飛躍的に向上させることが、等電点の多様性を持つ試料の分析には必要不可欠であった。そこで、IEF法の確立と併せて泳動後に赤血球寒天平板を重層させる高い感度と分離能を持つサイモグラム法

を用いることにより、SLOの等電点の多様性を確認し、これまでの報告値の不一致の原因を明らかにすることが出来た。また、SLOの等電点と溶血効率が比例することも明らかになり、この溶血効率が毒素の溶血機序を知る指標になり得る可能性を指摘した。

次に、主に3つの課題について研究を展開してきた。第一に毒素の溶血機序を知る指標となり得る溶血効率のSLO以外の毒素への適用、およびそれら毒素の性状解析である。対象とする溶血毒素はレンサ球菌A～G群の産生する溶血毒素、SLOと同様のSH基活性化毒素ファミリー等である。第二は溶血機序の解明である。基礎的な物理化学的性質を踏まえて、赤血球膜脂質二重層内での毒素分子の挙動について、超微形態およびリポソームを用いた実験系により検討を進めた。第三に平成4年より本邦で発症、また、世界的な規模で報告された劇症レンサ球菌感染症の病態解析である。これまでに本邦でも300症例を越える患者数が報告され、死亡率が高いこともあり、本症例の解明が急がれていた。ここでは、溶血毒素に加えて、軟部組織壊死の原因物質であるproteinase、さらに免疫系を攪乱するスーパー抗原活性を持つ発赤毒素についても検討を行った。以上の3課題に加えて、環境汚染物質と健康の関わりについても二次元電気泳動法を用いた血清分析に取り組み知見を得た。

振り返ると、研究および教育における有力な手技として電気泳動法を駆使して取り組んできた。結びに、電気泳動マエストロであった恩師の故小林貞男先生に深く感謝を申し上げる。



本年2月の卒論発表会終了時に研究室員と。最前列の左から2人目が坂口先生、同3人目が鈴木先生です。

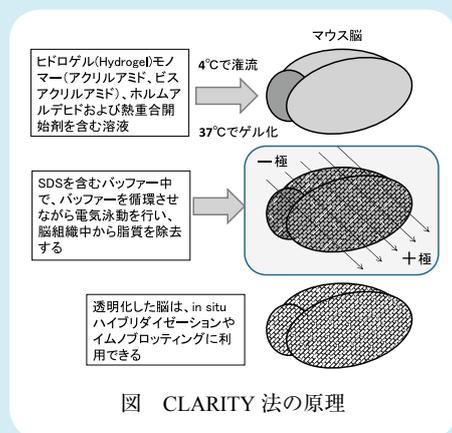
# TOPICS

## 脳から脂質を除去し透明化する新たな電気泳動法 (CLARITY 法)

(北里大学 大石正道)

2013年に、これまでと全く異なる電気泳動法の利用法が発表され、現在注目を集めている。従来、電気泳動法は、低分子有機化合物、核酸やタンパク質などの生体分子の分離・精製に用いられることがほとんどだった。ところが、スタンフォード大学のKarl Deisseroth教授らのグループは、電気泳動法を組織化学に用いて革命をもたらした<sup>1)</sup>。すなわち彼らは、マウス脳中にヒドロゲル (Hydrogel) モノマー (アクリルアミド、ビスアクリルアミド)、ホルムアルデヒドおよび熱重合開始剤を含む溶液を4℃で灌流し、その後、温度を37℃にあげて3時間放置し、脳内でゲル化させた。ホルムアルデヒドは脳組織中のタンパク質分子同士を架橋するだけでなく、水和ゲルモノマーとタンパク質、DNAおよび低分子化合物との間も架橋する。しかし、ホルムアルデヒドは脂質とは架橋を形成しないため、脂質はヒドロゲルには結合しない。通常組織化学の手法では脂質の除去に有機溶媒を用いるが、彼らはSDSを含むバッファーを大量に用いて電気泳動を行うことで脳から脂質の除去を行った。有機溶媒を用いると蛍光色素の蛍光が弱まるが、SDSはGFP、YFP、RFPなど蛍光タンパク質の蛍光強度にほとんど影響しないからである。このようにして透明化した脳は、脳組織全体を用いたin situハイブリダイゼーションやイムノプロットティングにも利用できる。組織切片を中心に発展してきた病理学の研究手法を大きく変化させる可能性さえ秘めている。

1) Chung *et al.* Nature. 2013;497:332-337.



## 血清遊離軽鎖検査法を用いた骨髄腫治療の効果判定

(東京大学医学研究所 安井 寛)

多発性骨髄腫は難治性の形質細胞腫瘍であり、モノクローナルな免疫グロブリン (M 蛋白) の増加がみられます。近年の骨髄腫治療の進歩により<sup>1)</sup>、完全寛解 (CR: complete remission) に至る症例が増え、より深いCRの定義が提唱されております。その一つがstringent CRであり、従来のCRの基準 (骨髄内形質細胞<5%、腫瘍病変なし、免疫固定法陰性化) に加え、血清遊離軽鎖の正常化が求められております<sup>2)</sup>。血清遊離軽鎖法は、従来のM蛋白検出法 (蛋白分画、免疫電気泳動法、免疫固定法) に比べ、高感度で、定量的な評価が可能であり、本邦ではM蛋白血症の補助診断検査「免疫グロブリン遊離L鎖  $\kappa/\lambda$ 」として2011年9月に保険収載されました<sup>3)</sup>。重鎖の半減期 (IgG: 21日、IgA: 6日、IgD: 3日) に比べて、血清遊離軽鎖の半減期は数時間と極めて短いことから、治療によるM蛋白への影響も早期に検出できます (図)。骨髄腫の治療中、血清遊離軽鎖が正常化するもM蛋白が残存し、担当医より結果の解釈について質問されることがありますが、遊離軽鎖と重鎖の半減期の違いを説明すると納得されます。実際、血清遊離軽鎖の正常化後、免疫固定法が正常化するまで平均4か月ほどかかるという報告もあります。血清遊離軽鎖検査法が臨床導入され、骨髄腫の診療に役立っております。

- 1) Yasui H, *et al.* Cancer Sci. 2012;103:1907-1912.
- 2) Durie BG, *et al.* Leukemia. 2006;20:1467-1473.
- 3) 藤田清貴. モダンメディア. 2012;58:278-283.

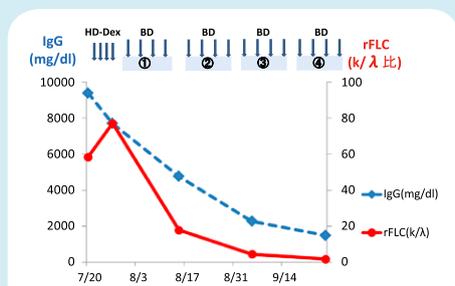


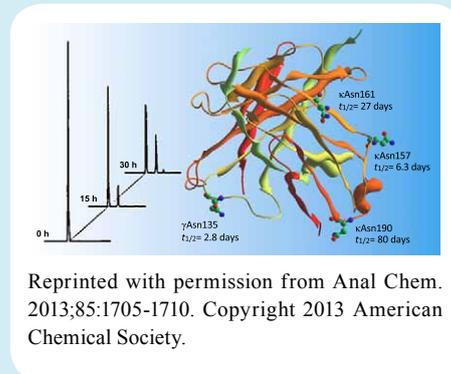
図) 血清遊離軽鎖法により、早期に治療効果をモニタリングできた一例。症例はIgG  $\kappa$ 型骨髄腫の初発例。高容量デキサメサゾン療法 (HD-Dex) では血清遊離軽鎖は減少しなかったが、ボルテゾミブ・デキサメサゾン併用療法 (BD) への治療変更により速やかに減少した。翌年2月には、免疫固定法の正常化が確認され、sCRと判定された。

## 部位指定変異によるアスパラギン残基の脱アミド速度決定

(福島医大 志村清仁)

アミド基を側鎖にもつアミノ酸にはアスパラギン (Asn) とグルタミン (Gln) がある。遊離のアミノ酸ではAsnよりGlnの方が速く脱アミドを起こすが、タンパク質の場合には、N末端のGlnを除いて、Asnの方が速い。Asnの脱アミドはAsnのC末端側のペプチド結合のイミノ基がアミド基のカルボニル炭素を攻撃してスクシンイミド中間体を経て起こる。この中間体の加水分解によってAsp残基あるいはiso-Asp残基が生成する。Asn残基のC末端側にGly, Serなどの小さい側鎖のアミノ酸残基があると、この反応は速くなることが知られている。したがって、一次構造から脱アミドしやすいAsn残基をある程度特定でき、トリプシン分解ペプチドのマス解析からそれを確認することができる。しかし、この手法では実際にどの残基がどのくらいの速度で脱アミドを起こすのかを定量的に調べることは難しいようである。また、1つのペプチド中にAsnが複数存在する場合も解析が困難になる。我々は組換えFabの定常領域中の5つのAsn残基についてSerへの変異体を個々に作成し、脱アミド反応によって主ピークがどのように減少して行くかをキャピラリーIEFによって追跡した。その結果、すでに知られていた2箇所のAsn残基に加えて、もう1つの比較的脱アミドの速い残基を特定するとともに、それらの半減期を2.8日、6.3日、27日と決定した<sup>1)</sup>。少々根拠があるが、組換えタンパク質については有効な方法と思われる。

- 1) Shimura K, *et al.* Anal Chem. 2013;85:1705-1710.



# 第64回日本電気泳動学会総会

平成25年11月15(金),16(土)日

会場:東北福祉大学ステーションキャンパス

総会長:船渡 忠男

## 11月15日(金)

### 教育講演

14:10 ~ 14:50

「ファーマコゲノミクス(PGx)情報を利用した個別化薬物療法の展開」

平塚 真弘(東北大学)

座長:近藤 格(国立がんセンター)

ランチョンセミナーI(協賛:栄研化学)

12:00~13:00

「LAMP法の原理と応用」

納富 継宣(栄研化学)

### シンポジウム

15:00 ~ 17:50

「臨床診断に有用な電気泳動法」

座長:前川 真人(浜松医科大学)

蔵満 保宏(山口大学)

(1) 電気泳動技術の臨床的意義

前川 真人(浜松医科大学)

(2) 酵素解析

森山 隆則(北海道大学)

(3) 免疫グロブリン解析

藤田 清貴(群馬パース大学)

(4) 尿蛋白解析

芝 紀代子(文京学院大学大学院)

(5) バイオマーカー開発を目指したプロテオーム解析で活躍する電気泳動法

近藤 格(国立がんセンター)

## 11月16日(土)

### 特別講演

10:50 ~ 11:50

「基礎と臨床の連携による疾患バイオマーカー探索」

野村 文夫(千葉大学)

座長:中村 和行(山口大学)

ランチョンセミナーII(協賛:エーアンドティー)

12:00~13:00

「蛋白分画検査の知られざる能力の発見」

片岡 浩巳(高知大学)

### テクニカルセミナー

13:00~15:00

「若手のための電気泳動技術」

座長:戸田 年総(横浜市立大学)

(1) プロテオミクス解析技術の基礎

山中 秀徳(化学物質評価研究機構)

(2) 疾患プロテオーム・メタボローム解析

斉藤 邦明(京都大学)

(3) 新しい電気泳動技術

大石 正道(北里大学)

(4) キャピラリー電気泳動技術

志村 清仁(福島医科大学)

国際交流奨励賞受賞講演・一般演題発表(口演)等

総会事務局 竹田真由(〒632-0018奈良県天理市別所町80-1 天理医療大学医療学部臨床検査学科)  
TEL: 0743-63-7811(代) E-mail: takeda@tenriyorozu-u.ac.jp

