

タンパク質の電気泳動を利用した 魚類の系統の解析

2526 林 晃世 2525 野田 真衣

生物のからだは、タンパク質で形作られている。またそのタンパク質は、遺伝子により分子構造を指定され、その様々な組み合わせにより個性のあるひとつの個体が作られている。そこで多種の魚の筋肉に含まれるタンパク質の分子量をもとに違いを調べ、その結果が似ているものから順に並べ、現在提示されている系統樹のひとつと比較した。

しかし、確定付けるには実験データがまだまだ少なかったため、タンパク質を中心に見た魚の進化の過程を確定することはできず、前述の系統樹の追認をはっきりと言うことはできなかった。

- 1 目的： 電気泳動ではタンパク質の分子量や含まれている量を調べることができるので、そのことを利用して見た目だけではわからない魚類の系統の分類をタンパク質レベルでおこないたい。系統の分類をしようと思ったのは、この実験ではタンパク質に着目しているため、骨格や器官のつくりなどで分類された今までの系統図とは違いが出てくるのではないかと考えたからだ。現在ある系統樹とは違った新たな魚どうしのつながりや進化の過程が発見できるかもしれない。さらに、最終目標としてタンパク質を中心に見た独自の新たな魚類の系統樹を作りたい。

2 使用した器具&薬品

サンプルバッファの作成

薬品： 1M Tris-HCl pH 8.0
 SDS (ドデシル硫酸ナトリウム)
 2 xメルカプトエタノール
 グリセリン (グリセロール)
 1%BPB溶液
 純水

器具： マイクロピペット(2-20 μ ?)
 (20-200 μ ?)
 (1.0m?)
 フィンチップ(~2 μ ?用、~200 μ ?用、先細チップ)
 メスフラスコ・ビーカー・メスシリンダー・キムワイブ・
 メスピペット・ホールピペット (10m?、50m?)・
 電子上皿てんびん・pHメーター

電気泳動用の薬品・器具

- 薬品： サンプルバッファー
 1%BPB溶液
 タンパク質分子量マーカー
 泳動バッファー (Tris 1.25, グリシン7.2 g, SDS0.5 g を純水で500m?)
 染色液 (CBB)
 バジェロコンパクト12.5
 純水
- 器具： マイクロチューブ (1.5m?)
 0.2mlPCRチューブ
 マイクロチューブラック (1.5m?・0.2m?用)
 煮沸用フローティングラック (穴を開けた発砲スチロール)
 小型微量遠心器 (チビタン)
 ボルテックス (振とう器)
 CompactPAGE (泳動器)
 乳鉢・乳棒・タッパーフライ返し・鍋・コンロ・フライパン・包丁・まな板・
 パソコン・スキャナー・プリンター・プリント紙・ゴミ袋 (ゴミ箱)

3 実験の手順

サンプルバッファーの調整

薬品： 0.5M Tris-HCl pH6.8	1 m?	
10%SDS	2 m?	
2-メルカプトエタノール	0.6 m?	
グリセリン	1 m?	
蒸留水	5.4 m?	
1%BPB	数滴	(液が紺色になるまで)
<hr/>		
TOTAL	10 m?	

- ・ 5Mtris-HCl pH6.8 は、6.0g の Tris を蒸留水に溶かし、pH を 6.8 に調整してから 100m?にメスアップする。
- ・ 10%SDS は SDS(ドデシル硫酸ナトリウム)10g を蒸留水 100m?に溶かす。

タンパク質溶液の準備

魚は生の重量で 0.5 g を乳鉢に取り、サンプルバッファー 2 0 m?を加えて、よくすりつぶす。

肉混濁液をマイクロチューブに 1m?取って、チビタンで5分間遠心する。

上澄み液をマイクロピペット(20-200 μ ?)で 50 μ ?取って、0.2m?PCR チューブに入れる。

PCR チューブを煮沸用フローティングラック (発砲スチロール)に挿して、100 で5分間熱処理をする。

タンパク質溶液のポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE)

電気泳動器の準備

Compact PAGE の泳動槽部と電源部を分離しておく。電源部の AC アダプターはコンセントからはずしておく。

泳動バッファを泳動槽部の下のラインまで入れる。

PAGE-Compact を、点線に沿って切り取り、ゲルプレートを取り出す。くしを上方にゆっくりと抜き取る。

ゲルプレートをシールパッキン側に押し付ける。

このとき、ゲル底部に気泡が入らないようにする。

プレートホルダーを手前から奥へと止まるまで回転させ、ゲルプレートを泳動槽に固定する。

ゲルプレートの上端から 2 から 3 mm 下が緩衝液面になるように、上部層に泳動バッファを入れる。

くしを取り去った後のゲルのサンプル溝中に気泡がついていないか、ゲルの凸部が真っ直ぐに立っているか確認する。真っ直ぐでないときは、先端チップで直す。

マーカーおよび処理した泳動用試料を先端チップで 4 μ ? ウェルにアプライする。

熱処理の終わった泳動用試料には、BPB を 0.3 μ ? 加えて色をつける。

電源部を泳動槽部にセットし、泳動モードを設定し、アダプターをコンセントにつなぐ。メインスイッチを ON にしたら、RUN スイッチを押して泳動を開始する。

ブザーが鳴ったら、メインスイッチを OFF にして、アダプターをコンセントから抜く。

ゲルプレートを取り出し、フライ返しを使って、プレートからゲルをはがす。

タッパーの中の染色液(CBB)にゲルを入れる。

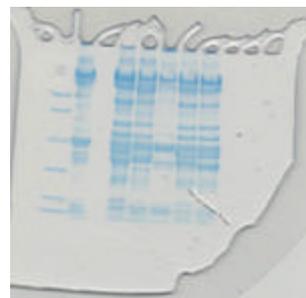
約 40 分間振とうしながら、染色する。

水の入った容器に移し、水を交換したりキムワイブを入れたりして、2 時間~ 1 日かけて脱色する。

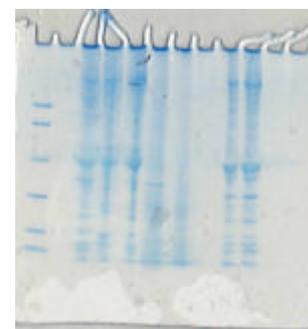
4 結果：次に調べた魚と得られたゲルを示す

なお、調べた魚は写真左から順に並んでいる。

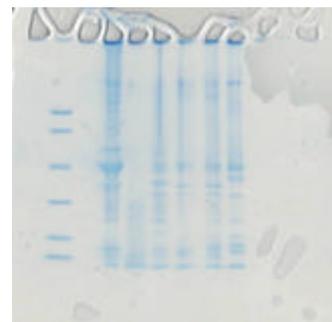
4月29日(金) 19
ゲル：12.5%PAGE
泳動モード：Tris-Gly high
泳動時間：30分
染色時間：40分
脱色時間：1日
染色液：CBB
調べた魚：マダイ・マアジ・サケ・タラ・キハダ・ハガツオ



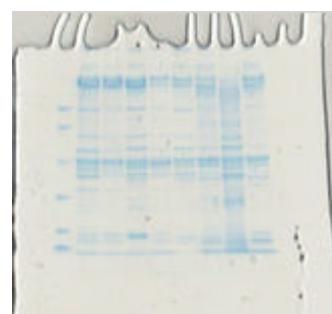
8月15日(月)
ゲル：12.5%PAGE
泳動モード：Tris-Gly high
泳動時間：30分弱
染色時間：50分
脱色時間：1日
染色液：CBB
調べた魚：ヒブダイ・グルクル・グルクン・アナハゼ・アユ・イワナ・ニジマス



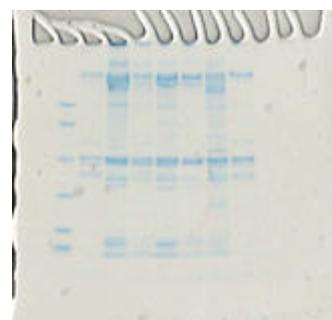
8月15日(月)
ゲル：12.5%PAGE
泳動モード：Tris-Gly high
泳動時間：30分弱
染色時間：50分
脱色時間：1日
染色液：CBB
調べた魚：沖縄の魚・シジミ・ウグイ・キジハタ・マアジ
・アマゴ



9月22日(木)25
ゲル：12.5%PAGE
泳動モード：Tris-Gly Low
泳動時間：55分
染色時間：50分
脱色時間：1日
染色液：CBB
調べた魚：アマゴ・ニジマス・アユ・ヤマメ・ボラ
・キュウセンベラ・カタクチイワシ・メジナ



9月22日(木)25
ゲル：12.5%PAGE
泳動モード：Tris-Gly Low
泳動時間：55分
染色時間：50分
脱色時間：1日
染色液：CBB
調べた魚：コモンフグ・イサキ・マダイ・キジハタ
・スズメダイ・アミメハギ・ウナギ



実験から得られた結果を解析する。ここでは、電気泳動で得られたゲルをスキャン・拡大コピーしたものを使って、手作業でバンドの移動度を求め、それぞれの魚を比較することにした。移動度とは、泳動ゲルの上端からバンドの位置までの距離を分子量マーカーを基準に算出した割合のことだ。なお、分子量マーカーは分子量が既知のタンパク質が入れられていて基準にできる。

それを利用して、泳動ゲルの上端からマーカーの一番下のバンドまでの距離を測り基準とし、目的のバンドの移動距離をその数で割ることで、移動した割合を求める。そうして、複数のゲルをマーカーを基準に比べた。

ただし、各バンドは幅がありバンドからの距離は目測で求めたのでその下部を測定したが誤差は生じる。また、ほぼ同じ分子量のものが存在した場合は区別ができない。

移動率	たんぱく質の	ウナギ	シカクチイワ	ウグイ	アユ	サケ	ニジマス	ヤマメ	マハタ	マアジ	イサキ	マダイ	クロメジナ	スズメダイ	ヒブダイ	ハガツオ	キハダ	アミメハギ	コモンフゲ
10																			
16																			
19																			
24																			
30																			
34																			
37																			
40																			
45																			
50																			
53																			
57																			
59																			
64																			
66																			
70																			
71																			
78																			
80																			
83																			
92																			
94																			
96																			
98																			

表 1

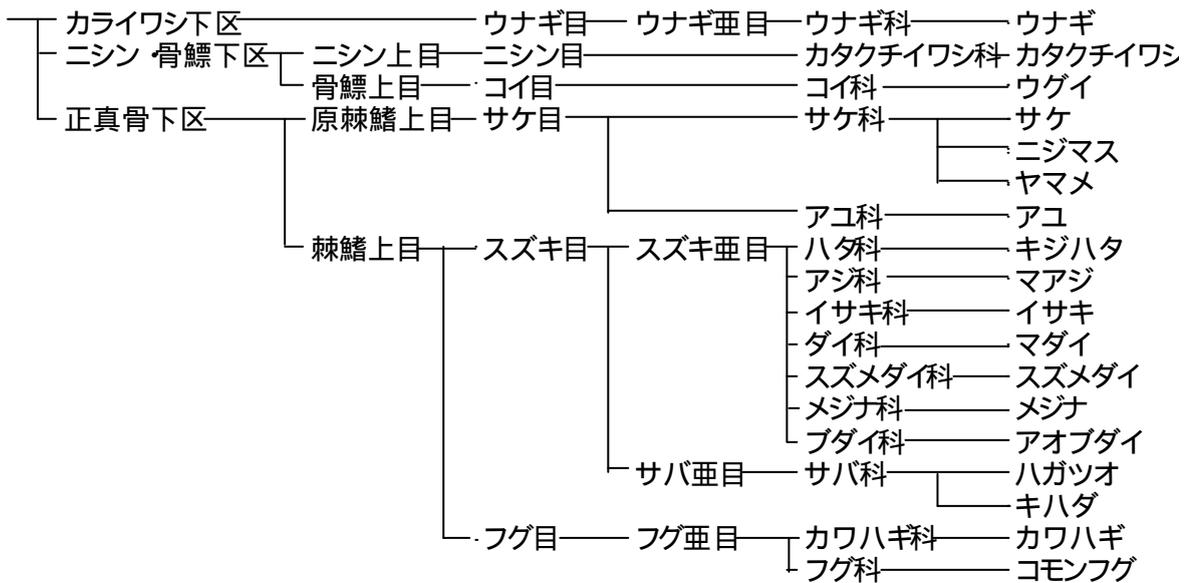
この表では、見られたバンドを記号化し、比べやすいようにした。 はバンドの色が濃く、幅も太いもの、つまり多くのたんぱく質が見られたものである。こうして見てみるとどの魚も似通ったバンドを示していて、似ている組み合わせの魚がいくつもみられる。しかし、詳しく分からないのでさらに魚同士を比べ、その一致率を求めることにした。

一致率は移動度の表で 24 項目を調べたので、その 24 項目中一致した項目数を数え、24 項目中何項目が一致しているかを百分率で計算したものである。それぞれ 2 種ずつの魚について一致率を求めたものが表 2 である。左下が一致した項目数、右上が一致率になっている。

	ウナギ	シ カタク チイ ワ	ウ グイ	ア ユ	サ ケ	ニ ジ マ ス	ヤ マ メ	マ ハ タ	マ ア ジ	イ サ キ	マ ダ イ	ク ロ メ ジ ナ	ス ズ メ ダ イ	ヒ ブ ダ イ	ハ ガ ツ オ	キ ハ ダ	ア ミ メ ハ ギ	コ モ ン フ グ
ウナギ		70.8	75	79.2	41.7	66.7	91.7	87.5	41.7	79.2	83.3	83.3	87.5	79.2	50	50	83.3	95.8
カタクチイワシ	17		37.5	66.7	62.5	54.2	37.5	66.7	54.2	58.3	62.5	62.5	58.3	58.3	62.5	70.8	54.2	58.3
ウグイ	18	9		62.5	41.7	75	75	70.8	37.5	62.5	66.7	66.7	70.8	70.8	50	41.7	58.3	79.2
アユ	19	16	15		45.8	62.5	79.2	75	45.8	75	70.8	79.8	75	58.3	45.8	45.8	79.2	29.2
サケ	10	15	10	11		41.7	41.7	54.2	75	54.2	58.3	50	45.8	37.5	66.7	75	58.3	37.5
ニジマス	16	13	1	15	10		75	79.2	25	70.8	75	83.3	79.2	79.2	41.7	37.5	58.3	70.8
ヤマメ	22	9	18	19	10	18		87.5	41.7	79.2	83.3	83.3	95.8	70.8	58.3	50	83.3	95.8
マハタ	21	16	17	18	13	19	21		37.5	91.7	95.8	95.8	91.7	83.3	54.2	54.2	79.2	83.3
マアジ	10	13	9	11	18	6	10	9		37.5	33.3	33	37.5	20.8	66.7	66.7	58.3	37.5
イサキ	19	14	15	18	13	17	19	22	9		87.5	87.5	83.3	75	45.8	45.8	79.2	75
マダイ	20	15	16	17	14	18	20	23	8	21		91.7	87.5	79.2	50	50	75	79.2
クロメジナ	20	15	16	19	12	20	20	23	8	21	22		87.5	79.2	50	50	75	79.2
スズメダイ	21	14	17	18	11	19	23	22	9	20	21	21		75	54.2	45.8	79.2	91.7
ヒブダイ	19	14	17	14	9	19	17	20	5	18	19	19	18		45.8	45.8	62.5	75
ハガツオ	12	15	12	11	16	10	14	13	16	11	12	12	13	11		91.7	58.3	54.2
キハダ	12	17	10	11	18	9	12	13	16	11	12	12	11	11	22		58.3	45.8
アミメハギ	20	13	14	19	14	14	20	19	14	19	18	18	19	15	14	14		79.2
コモンフグ	23	14	19	7	9	17	23	20	9	18	19	19	22	18	13	11	19	

表 2

5 考察：表から得られた結果を、インターネットで調べた系統樹を利用して比較する。タンパク質の分子
量から見た魚の系統は、骨格や器官で分類した系統と比べて、どうなっているだろうか？



ウナギを外群として得られた結果から独自に系統を探ってみた。ウナギと他の魚との相関を表をもとにグラフにした。上のグラフは最も一致率が低かったマアジとウナギについて、下のグラフはほぼ平均的だったニジマスについて調べた。

これを見ると、どちらのグラフ中でもマアジ、サケ、キハダ、ハガツオの4種は他の魚とは少し離れた場所にあり、他とは違ったタンパク質が含まれていると推測した。この4種に共通してみられる特徴は、白身でない部位を使ったことであり、何か血液に関係したタンパク質ではないかと考えられる。

次に、表2から、同じ一致率を示した魚をピックアップし、系統樹と比較した。ほぼ一致した魚の組み合わせは、

- スズメダイ・マハタ
- クロメジナ・マダイ・アミメハギ
- ハガツオ・キハダ
- イサキ・ヒブダイ
- マアジ・サケ

の5つだ。これらの魚は右のグラフでも近い場所に位置していることがわかる。

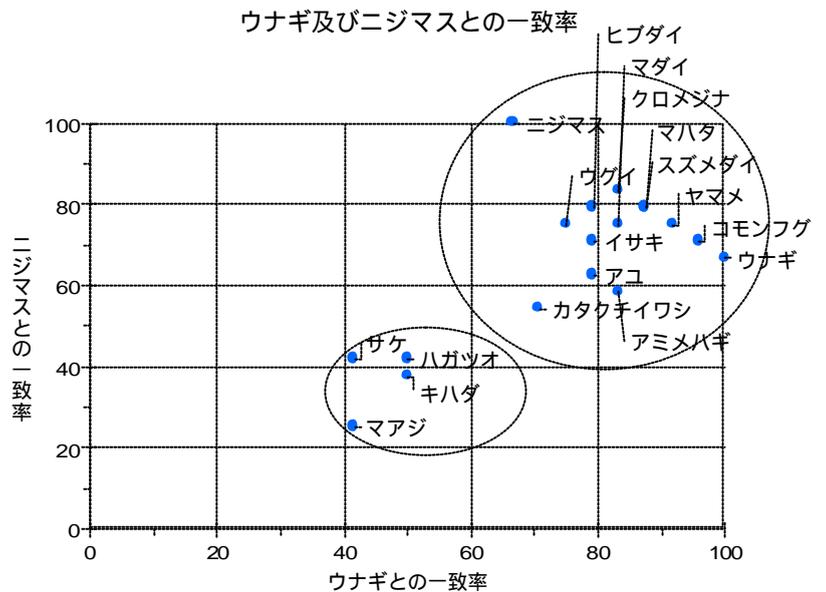
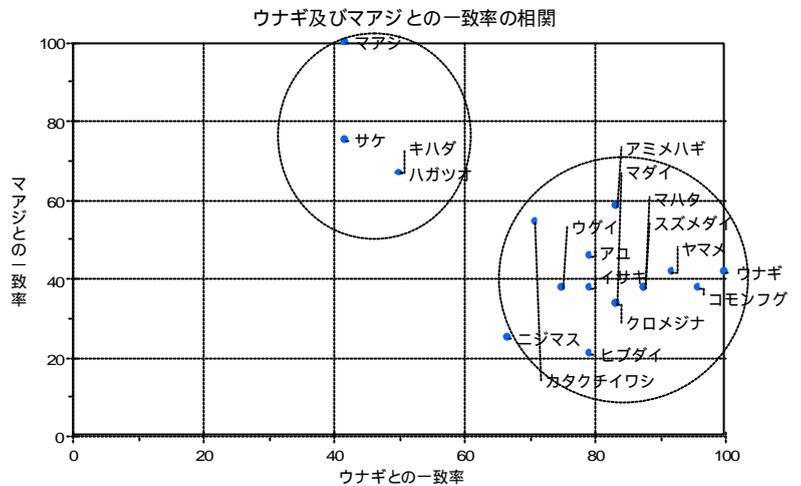
まず、は同じスズキ亜目に属しているため、系統樹でも近いといえる。同様のことが や でも言える。しかし、のクロメジナとマダイは確かに近いが、アミメハギはやや遠い系統にある。アミメハギはフグと近いはずであったが、そのフグと遠く、系統樹とは違っていた。また、のマアジとサケも系統樹ではやや遠くなっていた。

この原因として考えられるのは、単純に系統とタンパク質に関係がないこと、または、実験の回数が足りず、正確なデータが得られなかったことであると予測される。サケに注目すると同じサケ科のニジマスやヤマメと大きく異なっている。降海するものとならないものなど、環境の違いが関与しているかもしれない。しかし、ほかの3つの組み合わせでは近い系統を示していることから、タンパク質と系統を調べることが魚の進化の過程を探る手段となるかもしれない。

6 感想：

ここまでの解析ができると、実験データの不確かである部分が惜まれる。一年間（電気泳動をし始めたのは半年前ですが）研究をしてきて、今やっとどのようにしたら実験をスムーズに進められ、どのようにしたら実験の精度が上げられるかわかってきたためだ。この先も研究を続け、もう一度実験をし直すとしたら、より正確なデータが得られると思う。

魚という身近なものがテーマだったが、数多くの種類の魚を実験に必要な分だけ集めるのは大変だった。考察をしてみてわかったことだが、一度の実験だけで結論を導くことは不可能で、同じ種類でも何度も調



べる必要があるので、その面からいかに手に入れやすい試料を選ぶかが大切だとわかった。

実験をする上で大変だったのは、実験で最も重要な試薬であるサンプルバッファーづくりだ。これは自分たちで作るしかなく、これが上手くできなければバンドが出ないので、タンパク質の比べようもない。必要な薬品の濃度やpHの調整からしなければならぬので時間もかかった。また、できたサンプルバッファーで本当にきれいにバンドが出るか、確認のための実験もしなければならぬかった。泳動の条件をそろえるためにも試薬は重要であったがなかなかうまくいかず苦労した。

研究をするにあたって田村直明先生をはじめ、多くの方の協力を賜り、この場をお借りして、お礼申し上げます。

7 参考文献など

西方敬人, 1997, 「バイオ実験イラストレイテッド タンパクなんてこわくない」, 秀潤社
<http://3.pro.tok2.com/~lutrfish/index.html>