

全自動2次元電気泳動装置の実用化および新規プロットング装置の試作完了

チームリーダー 鵜沼 豊 (シャープ(株)研究開発本部 健康システム研究所第二研究室・室長)

サブリーダー 荒木 令江 (熊本大学大学院医学薬学研究部(医学部)・准教授)

Keyword プロテオミクス、タンパク質、2次元電気泳動、ウェスタンブロットング

タイプ 実証・実用化タイプ

開発課題名 全自動2次元電気泳動・ウェスタンブロットング装置の開発

■ 参画機関: 熊本大学

■ 開発期間: 平成21~23年度

課題概要

バイオ基礎研究から創薬開発・早期診断・個別化医療に繋がるプロテオーム解析研究の飛躍的な進歩に貢献するための、高速・高感度・高分解能をもつタンパク質解析ツールを開発する。当グループは従来不可能であった2次元電気泳動と電気的膜転写工程を自動化したプロトタイプ機を既に開発している。本開発では転写効率の向上を図るとともに、分解能・再現性・簡易性の向上等のレベルアップを図った実用機を開発する。

得られた開発成果の概要

1) 全自動2次元電気泳動装置の実用化

2次元電気泳動を全自動化するに当たって最も問題になる1次元目電気泳動完了後のゲルの2次元目への接続工程を改善した。

ゲルの変形、僅かな位置ずれが泳動結果に大きな影響を及ぼすが、当グループはゲルの精密搬送機構と接続機構の開発に成功し、使用チップ類の製造誤差、設定誤差等をキャンセルし毎回高精度な泳動結果を再現させることに成功した。また冷却能力の最適化と密閉性の向上、ユーザー

インターフェスの改良により全自動2次元電気泳動装置の商品化に成功した。

2) 新規プロットング装置の試作

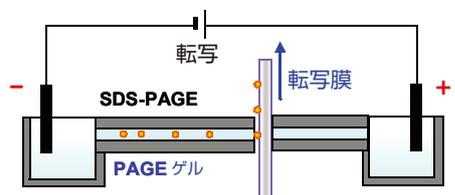
2次元電気泳動自動化から更に転写工程までを含めた連続自動化を目指し、当グループが開発した新規転写方法である「排出転写」方式試作機の小型化と簡易操作化を図った。分解能の向上のための分離ゲルと転写膜との接続構造、転写膜引き上げ機構の改良を行い90%以上の転写率、ばらつき(CV値)5%以下を達成し実用化に目処を得た。



全自動2次元電気泳動装置商品化
Auto2D BM-100



全自動2次元電気泳動・転写装置 実用化試作機



排出転写方式原理図



グリオーマ ビメンチンタンパク質の転写結果

3) 疾病プロテオミクスへの応用

当グループ熊本大学・荒木研究室は開発した全自動2次元電気泳動装置が少量のサンプルで分析可能であることを活用してこれまで識別が困難であったグリオーマ幹細胞と正常細胞とでビメンチンタンパク質の翻訳後修飾パターン

が異なり識別が可能であることを見出した。更に本開発装置の高分解能性を活かして抗がん剤の感受性の相違がタンパク質の翻訳後修飾パターンで判別可能であることを示すとともにその抗がん剤抵抗性の機序を明らかにした。

簡便・高速なタンパク質分析装置を実現し、医学・生化学の分野に貢献

1) タンパク質の網羅的な研究が進められているなか、簡易で高速なタンパク質分析装置が求められている。

2次元電気泳動法およびウェスタンブロットティング法は多数のタンパク質を同時に視覚的に捉えることができる優れた手法であるが、ゲルの取り扱い等に熟練を要していた。当グループの開発により全自動化され誰でも約100分で結果を得ることが可能となりプロテオミクス研究の展開の加速に貢献できる。

2) 従来比較

従来2次元電気泳動から転写までの作業は手作業で行なわれ、特に転写はゲルのカセットからの剥離および転写膜、電極との重ね合わせ等煩雑で誤差の大きな作業をとめない再現性の高い結果を得ることは困難だった。排出転写方式の開発によりゲルを剥がす操作が不要となり全自動化を達成した。

	本開発	従来
操作性	全自動	手作業・ゲルはがし操作が必要
全分析時間	2~3時間	3~4日
転写効率	90%以上	70%以下
定量評価	可(高再現性)	困難

3) 抗がん剤感受性に関するメカニズム解明と癌幹細胞特異タンパク質検出

当グループの熊本大学大学院生命科学研究部の荒木准教授は本開発の全自動電気泳動転写装置を用いて脳腫瘍のプロテオーム解析を行ない、リン酸化による等電点シフトが分離可能な性能を活かし、抗がん剤感受性の相違、及び抗がん剤耐性のメカニズム解明を行なった。また、極微量のサンプルで分析が可能な特長を活かし、癌幹細胞に特異的および分化によって発現するタンパク質を捉えることができ癌幹細胞研究に貢献することができた。

4) 疾病プロテオミクス研究の加速とオミックス医療

遺伝子に比べ遥かに複雑なプロテオミクスは必要性を認識されながらシステムチックな取組みは遅れていた。疾患サンプルからのタンパク質分離、質量分析にデータベース構築・検索、経路解析、検証実験、疾患モデル検証の研究サイクルのなかで本開発成果は検証実験のオートメーション化に貢献するものであり、オミックス医療へ向けての必要となる膨大な研究開発の効率化に貢献できると考える。

上記成果の科学技術的根拠

【出願特許】

1. 発明者：大木博、他5人 出願番号：2011-107651 発明の名称：ゲル固定用基材、電気泳動用反応器具、電気泳動用反応器具の製造方法及び電気泳動用キット
 2. 発明者：楠本晃司、他3人 出願番号：2011-108709 発明の名称：電気泳動方法、及び電気泳動装置
 3. 発明者：松永貴輝 出願番号：2011-128525 発明の名称：データ解析装置、データ解析方法およびデータ解析プログラム
 4. 発明者：荒木令江 出願番号：2012-075242 発明の名称：融合プロテオミクスによるNF1特異的タンパク質の同定方法、NF1特異的タンパク質発現抑制方法、NF1特異的タンパク質の腫瘍マーカー及び治療ターゲットとしての使用方法
- その他平成23年度17件出願

【発表論文等】

1. Silsivanit A, *Araki N, Pairojkul C, Wongkham C, Narimatsu H, Kuwahara K, Wongkham S, Sakaguchi N. ,A novel serum carbohydrate marker on MUC5AC: values for diagnostic and prognostic indicators for cholangiocarcinoma. Cancer, 117(15):3393-403, 2011
2. Esaki K, Terashima Y, Toda E, Yoshinaga S, Araki N, Matsushima K, *Terasawa H. ,Expression and purification of human FROUNT, a common cytosolic regulator of CCR2 and CCR5. Protein Expression and Purification, 77(1):86-91, 2011
3. Araki, N*, Integrated proteomics for studying cellular mechanism of neural tumor formation. Connective Tissue Research, 2012 in press