

授業研究

生化学の実験授業：

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法を利用してタンパク質の性質や高次構造を理解する－ コロナ禍での対面授業

市 原 啓 子*1)

たんぱく質は栄養素のひとつであり、生体においては構造的、機能的に大変重要な役割をもつ。SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (SDS-PAGE) はたんぱく質を分子量に応じて分離する技術である。泳動後にゲルを染色することでたんぱく質がバンドとして可視化され、バンドの分子量や本数からたんぱく質の構造的な特徴を推察することができる。健康栄養学科の生化学基礎実験では SDS-PAGE の原理とたんぱく質の構造について理解することを目的として5回のシリーズで授業を行ってきた。2020年以降、コロナ禍にあつて、実験の授業は教室の人数を半減させて実施することが求められた。半分の学生数で隔週で実験授業を行う方式では、実験は従来の半分の内容になる。内容を減らさずに実験を行うための方式として半分の人数で90分ずつ5回の実験授業を行うことにした。実験方法の説明は、Teams にアップした資料に文章と写真で行い、実験室での説明は極力短時間で行った。また試薬や器具の種類は極力少なくし間違いのないように準備した。その結果、実験の内容はおおむね従来どおりで実施することができた。本稿はその授業記録である。

キーワード：polyacrylamide gel electrophoresis, serum albumin, immunoglobulin G

I. はじめに

たんぱく質は栄養素のひとつであり、生体においては構造的、機能的に大変重要な役割をもつ^{1,2)}。高等学校の生物の教科書では、たんぱく質の構造 (アミノ酸配列) が遺伝子によって決定される事、たんぱく質が熱や酸などで変性すると本来の機能を失う事などが記載されている。しかしながら、たんぱく質を具体的にイメージできるのは卵白、肉、スキムミルクといったもので、ここからたんぱく質の構造や性質を理解することは難しい。

ポリアクリルアミドゲルを支持体とするたんぱく質の電気泳動は1960年代初頭から報告されている。ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) や尿素などの変性剤でたんぱく質を可溶化し、2種類のゲルを用いた不連続緩衝系ゲルで電気泳動を行うと高い分離能でたんぱく質を分離できる^{3,4)}。SDS-たんぱく質複合体では、もとのたんぱく質の荷電状態の違いに影響されずば分子量の違いだけに基ついで分離できる⁵⁾ことから、

SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (SDS-PAGE) はたんぱく質を分子量の違いで分離する方法として多くの生化学的研究で利用されている。さらにゲルを染色することでたんぱく質を可視化でき、たんぱく質を構成するポリペプチドの分子量と本数がわかることから、たんぱく質の構造的な特徴を推察することができる。健康栄養学科の生化学基礎実験では従来5回のシリーズで SDS-PAGE の原理とたんぱく質の構造について理解することを目的として授業を行ってきた。

2020年以降のコロナ禍にあつて、実験の授業は教室の人数を半減させて実施することが求められた。半分の学生数で隔週で実験授業を行う方式では実験回数は従来の半分、内容も半分にならざるを得ない。実験内容をなるべく減らさずに授業を行うための方式として、回数は5回そのまま半分の人数で90分ずつ実験を行った。実験方法の説明は、Teams にアップした資料に文章と写真で行い、実験室での説明は極力短時間で行った。学生には必ず予習して参加することを伝え、当日の説明は最小限にし、学生の操作を中心に時間配

* 1) 愛知学院大学心身科学部健康栄養学科

(連絡先) 〒470-0195 愛知県日進市岩崎町阿良池12 愛知学院大学心身科学部 E-mail: kichi@dpc.agu.ac.jp

分を組んだ。本稿はその授業の記録である。

II. 授業の概要

授業は、2022年6月21、28日、7月5、12、19日の5回、14号館生理学・生化学実験室で実施した。参加者は助手1名、健康栄養学科2年生A組39名B組37名である。A組B組とも学籍番号順に前半グループと後半グループに分けた。時間割はA組が1・2限、B組が3・4限である。対面授業は、A組の前半が1限、後半が2限、B組は前半が3限、後半が4限として実施した。1回の授業は実験台ごとに2名を一組として配置した。全5回の授業の概要を表1に示す。11回と12回、13回と14回の実験での説明や結果はそれぞれ図1、図2に示す。

III. 結果と考察

各回ともこれまで90分×2として実施してきた授業のなかで、実験室でなければできない操作で70分程度で終了できる内容を精選した。1日に4回同じ授業を行うこと、授業ごとの学生の入替え時間が限られていることから、使用する機器や試薬を限定し間違いがおこらないよう準備した。学生には、時間制限があるので失敗するとやり直しできないことを伝えた。

5回の授業では、これまでと同様SDS-PAGEを2回、Rf値の計算と片対数方眼紙へのプロットを2回行った。従来のSDS-PAGEの実験授業では学生の自作ゲルに試料をのせて電気泳動を行っていた。所要時間はゲル作成に40分、試料を乗せて泳動開始までに15分、電気泳動に50分ほどである。今回は自班が作成したゲルに試料をのせることをやめ、前のグループの学生が作ったゲルに試料をのせて電気泳動を行った。泳動が終了するまでの時間にゲル溶液を調製してガラス板の間に流し込みゲル作成した。このゲルを次のグループの学生が使うことでゲルの作成と電気泳動とを実行することができた。電気泳動の間、泳動バッファの電気分解で泡が発生したり、ゲルの中をたんぱく質が移動する様子を学生が興味深く観察していた。学生は失敗しないよう実験に集中していたように思う。

分子量マーカーに含まれる異なるサイズのたんぱく質（着色済み）は、電気泳動によりゲル内を移動し何本ものバンドとして見ることができた。たんぱく質が固有の大きさをもつ分子であり、大きさの順に分離することを確かめる実験となった。また、免疫グロブリン

ンG (IgG) は、還元剤ありで2本のバンド（H鎖50kDaとL鎖25kDa）、血清アルブミンは1本のバンド（66kDa）があらわれた。IgGの結果は、還元剤でジスルフィド結合が切断されて2本のポリペプチドに分かれたためである。還元剤なしではIgGは200kDaの1本のバンド、血清アルブミンも1本のバンド（70kDa）であった。この結果から血清アルブミンは1本鎖構造をもつこと、IgGはH鎖とL鎖が2本ずつジスルフィド結合で連結した分子であることがわかる。たんぱく質の研究から、生体内には1本のポリペプチドで機能するものや複数のポリペプチドがジスルフィド結合などで連結して機能するものなど多種多様なたんぱく質が見出されている。今回の実験からたんぱく質の性質や構造に興味を持ってくれることを期待したい。

15回はたんぱく質の特徴をまとめる目的で学生発表を行った。さらに、学生には毎回の授業について、よくわかった点、わからなかった点や質問、次回の努力目標を書いてもらい、次の回到教員からのコメントをつけて返却した。質問には必ず文章で回答した。きちんと予習することで手際の良い実験操作ができると考えた学生が回を重ねるごとに多くなっていった。今回の事例から、実験や結果のまとめを通して「知識・技能の習得」「判断力、思考力を深める」「協調性、助け合う力」を培うことができたと考えられる。実験の準備は大変忙しかったが、限られた時間でも実験の回数を確保することは内容をより深く理解することに有効と思われる。

IV. 今後の展望

本稿では対面での授業時間を半減させるが授業回数を維持する取り組みを報告した。毎週学生全員と対面することで、学生をつまづきや説明のわかりにくい点などに気づくことができた。試薬や使用する機器などは、配布資料に詳しく説明を載せたが、読んだだけでは十分に理解できていない学生もいた。授業が以前の方式にもどると時間的な余裕ができる。学生への説明はゆっくり丁寧に行い、実験操作および実験結果についてじっくり考えてもらう時間がとれることを期待する。

文献

- 1) ネルソンD, コックスM (2015) レーニンジャーの新

- 生化学, 広川書店 pp. 329-388, 東京化学同人
- 2) 村松陽治編 (2012) エキスパート生化学, 化学同人 5) 岡田雅人, 三木裕明, 宮崎香 (2011) 改訂第4版たんぱく質実験ノート下巻, pp. 17-30, 羊土社
- 3) Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. Nature, 227, pp. 680-685 (最終版令和5年1月23日受理)
- 4) 真鍋敬 (1989) 新生化学実験講座, I たんぱく質,

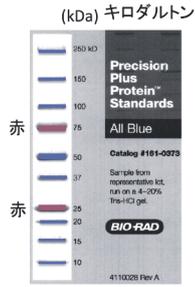
表1 授業進行と学生の活動

| 回 | 形式 | 内容 | 学生の活動 |
|----|-------|---|---|
| 11 | 1. 課題 | 第11回の実験資料を Teams にアップロードする. | (予習) Teams より11回の実験資料にアクセスし, 日程と対面授業の時間割を確認する. 資料をみて実験の内容を確認し, 手順を実験ノートに書く. |
| | 2. 対面 | (導入) 日程とグループ分け, 実験の進め方, 機器, 試薬について説明. (10分) (展開) SDS-ポリアクリルアミドゲルで電気泳動を行う. (70分) 1) SDS-ポリアクリルアミドゲル (10%, 15%) に分子量マーカー (図1A) をのせる. 2) 電気泳動装置と電源装置を接続し通電, 電気泳動を開始. (図1B) 3) 電源を切り泳動終了. ゲルを泳動装置から取りはずし, マーカーたんぱく質の分離を確認. * 泳動中の待ち時間を利用し, ゲル作成用の用具の確認・組立てを行う. (まとめ) 次回の実験の予告, 片付け. (10分) | 対面授業の日程を確認する. →試薬と使用量, 機器の取扱いを確認 →マイクロピペットで分子量マーカー溶液をはかり, ゲル上端のサンプルウェルにいれる. →時間経過とともに分子量マーカーの着色たんぱく質が次々にバンドとして現れることを観察する. →泳動終了後のゲルを観察し, バンドの分離の様子をノートに記録する. (図1C) →ゲルを作成するためのガラス板の組み立てを行う. (図1G, H) ゲル作成用の用具 (ガラス板, パッキン, スペーサー, コーム, クリップ) を組立てる. ゲルの作成の手順を理解する. 自己点検シートの記入・提出 |
| 12 | 1. 課題 | 第12回の実験資料を Teams にアップロードする. | (予習) Teams より12回の実験資料にアクセスし, 実験の内容を確認する. 実験ノートに手順と実験結果を集計する表を書く. (復習) 実験結果を実験ノートにまとめる. |
| | 2. 対面 | (導入) SDS-PAGE の原理の説明, 実験の手順の説明. (10分) (展開) ポリアクリルアミドゲル電気泳動でのたんぱく質のサイズと移動度の関係. (70分) 1) 11回で泳動した2種類のゲル (10%, 15%) で分子量マーカーのバンドを観察. 2) バンドの移動距離と相対移動度の計算 3) 相対移動度 (x/L) の計算方法と片対数方眼紙の使い方 (図1E) を説明し, グラフを作成する. | SDS-PAGE では, たんぱく質の小さい分子は速やかに移動するが, 大きい分子は少しずつ遅れて移動するために, たんぱく質は大きさの順にバンドが分離することを理解する. →アクリルアミド濃度が異なると同一の試料でも分離するたんぱく質の本数や移動距離が異なることを観察. (図1C) →分離の開始点から先端までの距離 (L), 開始点から各バンドまでの距離 (x) についてゲルに物差しをあてて mm 単位で測定し, 表に記入する. (図1D) →計測した値を用いて各バンドの相対移動度 (x/L) を計算する. |

| | | | |
|----|-------|---|--|
| | | <p>(まとめ) たんぱく質が大きいと相対移動度が小さくなることを確認。片付け。(10分)</p> | <p>→片対数方眼の横軸を相対移動度 (Rf 値), 縦軸をサイズ (kDa) として泳動の結果を方眼紙にプロットする。(図1F) 点が右下がりに並ぶことを確認する。ノートにグラフを添付する。</p> <p>自己点検シートの記入・提出</p> |
| 13 | 1. 課題 | <p>第13回の実験資料を Teams にアップロードする。</p> | <p>(予習) Teams より13回の実験資料にアクセスし、実験の内容を確認する。手順を実験ノートに書く。 (復習) 実験結果を実験ノートにまとめる。</p> |
| | 2. 対面 | <p>(導入) 実験手順、試薬の確認。(10分) (展開)</p> <p>1) 血清たんぱく質の電気泳動 (70分) 11回と同様、完成したゲル (全13レーン) を泳動装置にセットしておく。泳動試料を指示された順にゲルにのせ、電気泳動を行う。2班でゲル1枚。</p> <p>*ゲル作成 (電気泳動を行っている間) 組立済みガラス板を各班に1組配布。</p> <p>2) ゲル溶液の調製 分離ゲル溶液、濃縮ゲル溶液の調製法を配布資料で確認。ゲル溶液を調製。</p> <p>3) 分離ゲル溶液の流し込み。</p> <p>4) 濃縮ゲル溶液の流し込み</p> <p>5) ゲルの染色 (翌日、蒸留水で脱染色するとたんぱく質のバンドがみえるようになる。助手がゲルの写真撮影と印刷を行う。)</p> <p>(まとめ) 次回の実験の予告。片付け。(10分)</p> | <p>→泳動試料の種類と使用する体積を確認。 →ゲルの左端3レーンに還元剤入り試料 (血清アルブミン、免疫グロブリン、分子量マーカー)、中央をあけて右端2レーンに還元剤なし試料 (血清アルブミン、免疫グロブリン) を入れる。(図2A) →泳動バッファーを入れ、電源装置と接続、泳動開始。開始時刻を実験ノートに記録する。</p> <p>→分離ゲル溶液と濃縮ゲル溶液はともに TEMED 以外の試薬を間違えないようにそれぞれ遠沈管に入れて混合し、氷上で保管。</p> <p>→分離ゲル溶液に TEMED を加えよく混ぜたらガラス板に流し込み固める。 → TEMED を加えた濃縮ゲル溶液を分離ゲルの上部に流し込む。手早くコームを差し込み、ゲルを固める →泳動が終了したら、ゲルをガラス板からはずしてクマジー染色液に浸す。</p> <p>泳動装置の洗浄、片付け。 自己点検シートの記入・提出</p> |
| 14 | 1. 課題 | <p>第14回の実験資料を Teams にアップロードする。</p> | <p>(予習) Teams より14回の実験資料にアクセスし、実験の内容を確認する。実験ノートに手順と実験結果を集計する表を書く。 (復習) 実験結果を実験ノートにまとめる。</p> |
| | 2. 対面 | <p>(導入) 染色したゲルとゲルの写真を配布。本時の手順について説明。(10分) (展開) 分子量マーカーの移動度から、血清アルブミンと免疫グロブリンのバンドの分子量を推定する。(70分)</p> <p>1) 分子量マーカーのバンドについてそれぞれ移動距離を計測、相対移動度を求め、片対数方眼紙に点をとる。点をつないで検量線をひく。</p> | <p>実験ノートをもて13回のゲル電気泳動で用いた試料の種類とレーンの位置を確認する (図2B)。ゲルの写真を実験ノートに貼る。</p> <p>→染色済みのゲルについて、レーンごとに分離したバンドの本数を数え実験ノートに記録する。 →第12回と同様にマーカーの各バンドの分離開始点から移動した距離 (x) および分離開始点から泳動の先端までの距離 (L) を物差しで mm 単位で測定し、表に記入する。</p> |

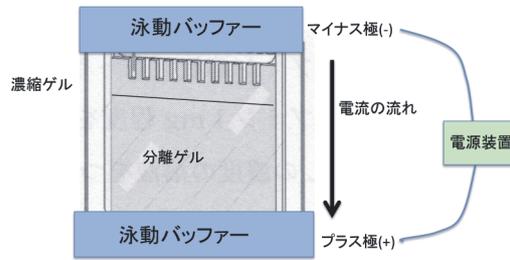
| | | |
|----|--|--|
| | <p>2) 血清アルブミン, 免疫グロブリンのバンドの本数を確認する.</p> <p>3) 血清アルブミン, 免疫グロブリンの還元剤ありで分離したバンドについて相対移動度を求める.</p> <p>4) 分子量マーカーの検量線を参照し血清アルブミンと免疫グロブリン Rf 値から分子量を推定する.</p> <p>5) 血清アルブミンと免疫グロブリンの分子構造をパワーポイントで説明 (図 IJ, K). 免疫グロブリンではポリペプチドを連結していたジスルフィド結合が還元剤によって切断されたため H 鎖と L 鎖がバンドとして現れる.</p> <p>(まとめ) たんぱく質には 1 本で機能するもの, 複数のポリペプチドがジスルフィド結合で連結して機能するものがある. 片付け. (10分)</p> | <p>→片対数方眼の横軸を相対移動度 (Rf 値), 縦軸をサイズ (kDa) としてマーカーのバンドについて方眼紙にプロットする (図 2C).</p> <p>→血清アルブミンは還元剤あり・なしで 1 本のバンドが現れる. 免疫グロブリンでは, 還元剤ありで 2 本と還元剤なしで 1 本のバンドの本数がみられる.</p> <p>→血清アルブミンと免疫グロブリンで還元剤ありのそれぞれのバンドについて移動距離を計測し, 相対移動度を求める.</p> <p>→分子量マーカーの検量線は分子量と Rf 値の関係を示すことから, 血清アルブミンおよび免疫グロブリンの 2 本のバンドの Rf 値を検量線にあてはめて分子量を推定し, 実験ノートに記録する.</p> <p>→教科書の免疫グロブリンの掲載ページから免疫グロブリンの H 鎖が 50kDa, L 鎖が 25kDa であることを確認. ゲル写真の免疫グロブリンの 2 本のバンドに H 鎖, L 鎖の説明を書き入れる. 還元剤がジスルフィド結合を切断することを理解する.</p> <p>自己点検シートの記入・提出, 片付け</p> |
| 15 | <p>1. 課題 第 15 回の実験資料を Teams にアップロードする.</p> <p>2. 対面 (導入) たんぱく質の性質について学生発表. 発表用のパワーポイントを PC のデスクトップにいれる. (20分) (展開) 班ごとに次の 1 から 9 より課題をえらび発表する. (60分) 1. たんぱく質の合成, 2. たんぱく質の構造, 3. 構造たんぱく質の役割, 4. 防御たんぱく質の役割, 5. 血液中の輸送たんぱく質, 6. 細胞膜上の輸送たんぱく質, 7. ホルモンたんぱく質, 8. 貯蔵たんぱく質, 9. 調節たんぱく質</p> <p>実験ノートのまとめ (まとめ) 栄養や代謝を理解する上でたんぱく質の種類や構造を知ることが大変に重要である.</p> | <p>(予習) 学生発表にむけてパワーポイントと発表原稿を作成する. (復習) 実験ノートに結果や考察をまとめる.</p> <p>→学生発表 班ごとに課題のなかから 1 つを選ぶ. 課題に関連したキーワードを考え一人 1 枚のパワーポイントのスライドを作成する. 班の持ち時間は 3 分間として発表を行う. 司会と進行は次の発表の班が担当.</p> <p>→発表が終わったら, 実験ノートに自分たちの発表の感想, その他の発表を聞いての感想を書く.</p> <p>自己点検シートの記入・提出</p> |

A 分子量マーカー

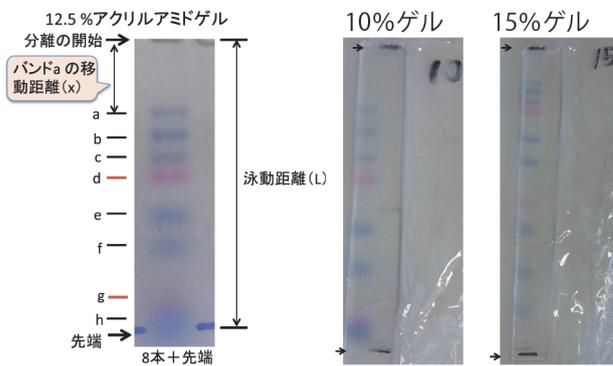


2色分子量マーカー Bio-Rad社

B. 電流の流れと電気泳動



C. マーカーたんぱく質の分離



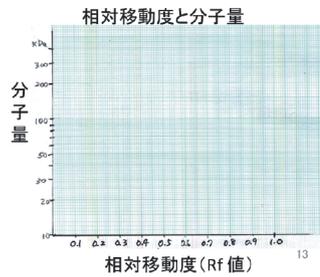
D. たんぱく質の移動距離とRf値

移動距離の計測

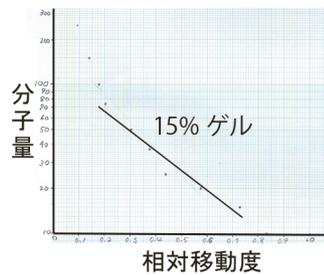
記入表

| 本数 | サイズ (kDa) | 10%ゲル | | 15%ゲル | |
|----|-----------|-----------|------|-----------|-----|
| | | 移動距離 (mm) | Rf値 | 移動距離 (mm) | Rf値 |
| 1 | 250 | | | | |
| 2 | 150 | | | | |
| 3 | 100 | | | | |
| 4 | 75 | | | | |
| 5 | 50 | | | | |
| 6 | 37 | | | | |
| 7 | 25 | | | | |
| 8 | 20 | | | | |
| 9 | 15 | | | | |
| 10 | 10 | | | | |
| | 先端 | | 1.00 | | |

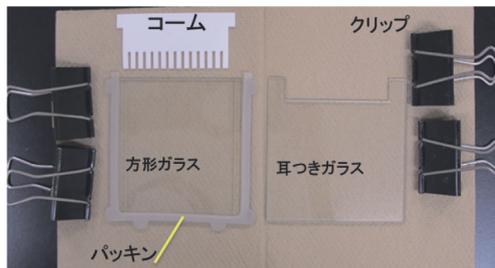
E. 片対数方眼紙



F. 相対移動度と分子量の関係



G. ゲル作成用ガラス板一式

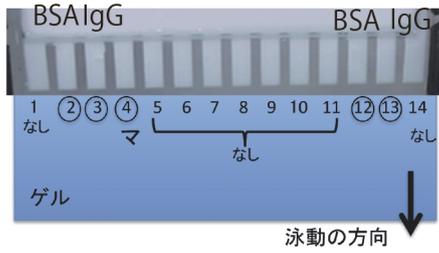


H. 組立て完成

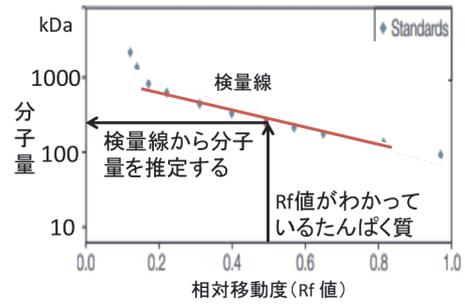


図1 11回と12回の説明資料

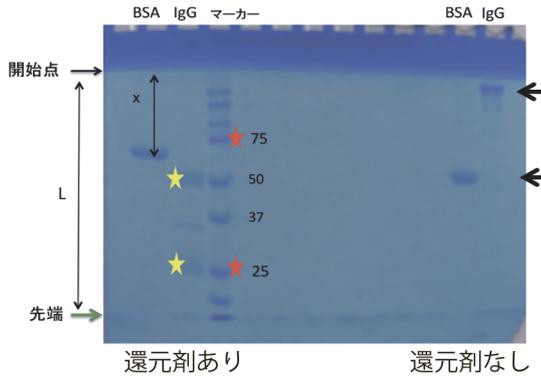
A. 血清アルブミンと IgG をゲルにのせる



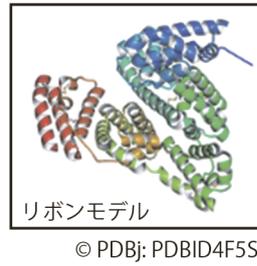
C. 相対移動度から分子量を推定する



B. 血清アルブミンと IgG の電気泳動結果



D. 血清アルブミンの構造



E. IgG の構造

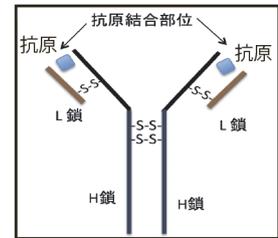


図2 13回と14回の説明資料

Class record

Practical training of basic biochemical experiment:

Understanding protein structures utilized with SDS polyacrylamide gel electrophoresis under the Covid-19 pandemic

Keiko ICHIHARA-Tanaka

Proteins are one of the essential nutrients and play important roles in both body construction and metabolism. To understand the structural and functional nature of proteins, SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) is a useful method because proteins are separated by their molecular sizes during electrophoresis. The separated proteins are visualized as bands on the gel after gel staining. These results represent that proteins have their molecular sizes and own structural features. For understanding the protein structures utilized with SDS-PAGE, practical experiments have been designated at the conventional schedule (90 min x2 per experiment, 5 times). Due to the corona crisis, face-to-face classes including experiments are held with half the number of students in order to avoid crowding in the laboratory, and some classes are held with experiments every other week, although training contents are reduced by half. I designated the practical training of SDS-PAGE without reducing the content as much as possible, thus classes were held at 90 min per experiment, 5 times. This is the class record of biochemical experiments during the Covid-19 pandemic.

Keywords: polyacrylamide gel electrophoresis, serum albumin, immunoglobulin G